

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular



**ENSAYOS PRECLÍNICOS *IN VITRO* CON CÉLULAS
ENDOTELIALES, COMO APROXIMACIONES
TERAPÉUTICAS FARMACOLÓGICAS PARA LA
TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA (HHT)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Virginia Albiñana Díaz

Bajo la dirección de la doctora

Luisa María Botella Cubells

Madrid, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**ENSAYOS PRECLÍNICOS *IN VITRO* CON
CÉLULAS ENDOTELIALES, COMO
APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS
FARMACOLÓGICAS PARA LA
TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA
HEREDITARIA (HHT).**

TESIS DOCTORAL

**VIRGINIA ALBIÑANA DÍAZ
Madrid, 2012**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



**ENSAYOS PRECLÍNICOS *IN VITRO* CON CÉLULAS
ENDOTELIALES, COMO APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS
FARMACOLÓGICAS PARA LA TELANGIECTASIA
HEMORRÁGICA HEREDITARIA (HHT)**

Memoria presentada por

VIRGINIA ALBIÑANA DÍAZ

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)
bajo la dirección de la Dra. Luisa María Botella Cubells



VºBº de la Directora de Tesis

VºBº de la Interesada

Dra. Luisa María Botella Cubells

Virginia Albiñana Díaz

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

SAF 2005-01090 del Ministerio de Educación y Ciencia. Periodo 2005-2008. *“Bases moleculares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I y II en España”*. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Investigador principal: Luisa María Botella Cubells.

Ayuda concedida por la Fundación Ramón Areces en el XIV Concurso Nacional para la Adjudicación de Ayudas a la Investigación Científica y Técnica. Convocatoria 2006. Área Biomedicina-Enfermedades Raras. *“Ensayos terapéuticos en células derivadas de pacientes con Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) y terapia célula-génica usando células progenitoras endoteliales en un modelo murino HHT”*. Periodo: 2007-2010. Investigador Principal: Luisa María Botella Cubells.

SAF- 2008-01218 del Ministerio de Educación y Ciencia. Periodo 2009-2011. *“Bases Moleculares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria y Ensayos de Terapias Farmacológicas Célulo-Génicas”*. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Investigador principal: Luisa María Botella Cubells.

Y gracias a las becas dirigidas a la doctoranda:

Beca predoctoral con cargo a la Ayuda concedida en el XIV Concurso Nacional para la Adjudicación de Ayudas a la Investigación Científica y Técnica de la Fundación Ramón Areces.

Beca de Investigación en Medicamento Huérfanos y Enfermedades Raras Santiago Grisolia otorgada por el Real e Ilustre Colegio de Farmacéuticos de Sevilla. *“Ensayos farmacológicos-terapéuticos en la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) “*



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

Dña. LUISA BOTELLA CUBELLS, Investigadora Científica en el Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA

Que Dña. Virginia Albiñana Díaz, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis que lleva por título: **“Ensayos preclínicos *in vitro* con células endoteliales, como aproximaciones terapéuticas farmacológicas para la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT)”**, y que reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

LA DIRECTORA,

Fdo. Luisa María Botella Cubells

Investigadora Científica, CSIC

AGRADECIMIENTOS

Parece que mi etapa madrileña va tocando su fin. ¿Quién me iba a decir cuando llegué a Cantoblanco que iba a estar 11 años por aquí? Años que han merecido mucho la pena, por todo lo aprendido y por toda la gente encontrada por el camino a la que tengo tanto que agradecer.

En primer lugar, dar las gracias a Luisa. Todavía me acuerdo del día que llegué a entrevistarme contigo para hacer el Proyecto Fin de Carrera... ¡No dudé un segundo que me quería quedar en el CIB! Gracias por darme la oportunidad de quedarme 4 años más y enseñarme a trabajar en ciencia. Desde el primer momento vi tu preocupación por la HHT y tu inquietud por poner un grano de arena en el bienestar de los pacientes, algo que dice mucho de ti. Gracias por tu paciencia, tu apoyo en todo, tu ilusión en el trabajo y tu dedicación en todo lo que te importa en la vida, dándolo todo por los demás. Por darme en cada momento la oportunidad de viajar y conocer novedades científicas y personas envidiables. Siempre te estaré agradecida que hayas sido mi directora de tesis y ante todo una buenísima amiga.

A Carmelo, por sacar siempre un hueco de tu apretada agenda para dedicarme un tiempo cuando te lo he pedido. Por tus buenos consejos e ideas propuestas y por estar siempre ahí cuando te hemos necesitado, Gracias.

¡Y a Paco! ¡Que si no es por ti nunca hubiera conocido la HHT! Por estar siempre dispuesto a ayudar, colaborar y tender una mano para lo que hiciera falta, muchísimas gracias.

Y bueno, ¡qué hubiera sido de estos cinco años sin las chicas del 109! Eva, ni te imaginas lo que he aprendido de ti, espero que tu etapa en Florida sirva para que por fin te des cuenta de lo mucho que vales ¡se te echa de menos! Luci, ¡esa mujer casada que tanta envidia me da! Gracias por aparecer por el CIB, porque has dejado huella. Lu, eres una trabajadora incansable de la que muchos deberíamos aprender y que siempre has estado ahí para todo, gracias y ¡Ánimo, que no queda nada! Y ese 108 vecino; Carmen, Crais (¡uy qué poquito te queda!), Mikel (ese paisano que anda tan silenciosamente!), Elisa (¡viniste de visita y te quedaste!), Eunete (qué rabia no poder conocerte más...) y Blanco, ese minijefe superpadre que vale tanto, desde el labo de al lado he aprendido mucho de ti. Y a nuestras compis Noe, Laura y Yenny. Muchas gracias a todos por hacer de mis años en el labo algo inolvidable.

También quisiera agradecer a Pedro y Maite de los Servicios generales del CIB su ayuda, tan necesaria en algunos momentos.

Y no me puedo olvidar de la Asociación española de HHT. En casi cinco años y tres reuniones de pacientes, he aprendido mucho de vosotros. En especial agradecer a Roberto, Santiago y Óscar siempre su amabilidad y cariño con nosotras, os deseo lo mejor.

Y ya fuera del CIB, no pueden faltar los años pre-tesis y ¡los primeros proyectos de Biólogos-Bioquímicos que fui conociendo! Ana, Sergio, Irene, Julia, Marcos, Laura, Manolo, Aitor...han sido tantos momentos: aquella estupidina y ese mochilo c....n, las llamadas de Croiqui-croiqui, mi acople en Praga-Viena-Budapest (¡no he pasado más frío en mi vida!), ese happy birthday-make a wiss...y muchos más, gracias a vuestra compañía. Y los dos últimos

años ¡¿qué habría hecho sin Ruty y Belén?! Gracias por esas quedadas después por Argüelles Belén, eres uno de mis mejores recuerdos de Madrid ¿Y quién que haya estado allí puede olvidarse de la RUCE? 6 años dan para conocer a mucha gente. Mi pasillo rosa y mi habita nº4 empapelada de fotos ¡Cuántos momentos chicas! Esas meriendas, esos paseos con las aletas, esos descansos en exámenes a las tantas de la madrugada, y muchas más cosas que no se olvidan. Miri, Evita, María, Esti, Marta (Cartagena) muchas gracias por esos años. Esther... ¡tía Nubeeee! Has sido, eres y serás alguien muy importante desde que hace 15 años el deporte nos uniera, ¡sin estar involucradas! ;-) Los años de la resi no hubieran sido lo mismo sin ti, muchas gracias por estar ahí siempre. ¡A mis chicas de Ferraz 33! Nuria, Marta, Lucía, Susana, Tania, Cata...muchas gracias por estos 4 años de los que tanto me ha costado desprenderme.

A mis alcazareños de siempre por ser como sois, por dar forma a este grupo tan majo tantos años que muchos envidian. Susi, Geno, Carmen, Marta, María, Raquel, Pili, MariMari, Jesús, DaniDani, David, JosePablo... ¡Gracias chic@s!

Y por último los más importantes. Quiero agradecer a mi familia todo el apoyo que me dan, el orgullo que demuestran de tener ¡a una casi Doctora! A la abuela Juliana y Nino ¡que tanto afán tienen en que descubra algo! a José, Jesús, Maribel y Paula. A la abuela Dominga, Paqui, los Ignacio's y Francisco. Por fin ya hay respuesta cercana a la pregunta: ¿Cuánto te queda hermosaaaaa? Al Abuelo Santiago, sé que te hubiera hecho ilusión estar con tu Chateja este día, y a mí también. Espero que me veas desde algún sitio, te echo de menos. A Chevi, por los casi 6 años compartidos. Por quererme, por comprender mis momentos de "agobio" y hacerme reír, por los viajes turísticos hechos y los que nos quedan por hacer ¡Hay que gastar la Nikon! Sólo sé que el siguiente paso que de, lo quiero dar contigo. A Anita, ¡ay qué rápido has crecido! Sígueme dando esos abrazos aplastantes que destrozan las costillas ¡aunque te regañe en el fondo me gustan! :-) Y bueno...sólo tengo palabras de agradecimiento para mis padres, porque nunca me han fallado y nunca me ha faltado nada. Me disteis la oportunidad de estudiar y os estoy muy agradecida. Siempre vais a estar ahí para lo bueno y para lo malo. Todo lo aprendido en casa me ha ayudado y me seguirá ayudando. Gracias por vuestra comprensión ¡sobre todo en los últimos meses de encierro en mi habitación! Muchas gracias a todos ¡os quiero!

¡GRACIAS!

Alcázar de San Juan, Marzo de 2012

.....

“No tenía miedo a las dificultades; lo que le asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros”

Pablo Coelho

.....

ABREVIATURAS

ACVRL1: *Activin A receptor type II-like 1*, también *ALK1*.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario a la hebra de ARN.

ALK: *Activin receptor-like kinase*.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

BMPs: Proteínas morfogenéticas oseas (*Bone Morphogenetic Proteins*)

BRE: Elemento respuestas a BMPs (*BMP Responsive Element*)

BSA: Albúmina sérica bovina.

AVM: Malformación arteriovenosa

CF: Citometría de flujo

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina.

c.p.m.: Cuentas por minuto.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

DTT: Ditioneitol.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*).

EMA: Agencia Europea del medicamento (*European Medicines Agency*)

EMSA: Ensayo de movilidad electroforética retardada (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

ENG: Gen de endogлина.

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*)

ERE: Elemento de unión al receptor de estrógenos (*Estrogen Receptor Element*)

EOMA: Línea celular inmortalizada derivada de endotelioma de ratón

FDA: Agencia americana del medicamento (*Food and Drug Administration*)

FGF: Factor crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor*)

FKBP12: Proteína de unión a FK506 (*FK506 binding protein*)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)

HHT: Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (*Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*)

HI: Hemangioma infantil

HIF: Factor inducible por hipoxia (*Hypoxia Inducible Factor*).

HRP: Peroxidasa de rábano picante (*Horseradish peroxidase*).

HMEC-1: Línea celular inmortalizada derivada de endotelio microvascular humano (*Human Microvasculature Endothelial Cell line-1*).

HUVEC: Cultivo primario de células endoteliales derivadas de vena umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).

ID1: Inhibidor de la diferenciación 1.

kDa: Kilodalton.

MAPKs: Kinasas activadas por mitógenos (*Mitogen activated protein kinases*),

MMP: Metaloproteasas de matriz (*Matrix Metaloproteases*)

MTT: Metil Tetrazolio

NAC: N-acetilcisteína

NFAT: Factor Nuclear del linfocito T activado (*Nuclear Factor of activated T cells*).

NF- κ B: Factor nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NO: Óxido nítrico (*Nitric Oxide*)

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*)

Pb: Pares de bases.

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

RE: Receptor de estrógenos

ROS: Especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

r.p.m.: Revoluciones por minuto.

R-Smad: Smad regulada por receptor.

RT-PCR: Retrotranscripción de ARNm a ADNc seguida de reacción en cadena de la polimerasa del ADNc.

SBE: Sitio de unión a Smad (*Smad Binding Element*).

SBF: Suero bovino fetal.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SERM: Modulador selectivo de receptor de estrógeno (*Selective Estrogen Receptor Modulator*)

Sp1: Proteína de especificidad 1 (*Specificity Protein 1*).

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA.

TBS: Tampón Tris salino (*Tris Buffered Saline*).

T β RI y T β RII: Receptor I y II de TGF- β

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor β*)

TNF α : Factor de necrosis tumoral (*Tumoral Necrosis Factor α*)

uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*Urokinase-type Plasminogen Activator*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VSMC: Células musculares lisas de la vasculatura (*Vascular Smooth Muscle Cells*)

WB: Inmunodetección de proteínas (*Western Blot*).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Vasculogénesis y Angiogénesis	3
2. Estructura de los vasos sanguíneos y función	5
3. El endotelio y su función	6
4. Superfamilia de TGF- β en la biología endotelial	7
4.1 Señalización de TGF- β	8
4.2 Señalización de TGF- β en células endoteliales	10
4.3 Estado de activación-resolución del endotelio	11
5. Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria o Síndrome de Rendu Osler Weber	13
5.1 Manifestaciones clínicas	13
5.2 Base genética	16
5.2.1 Endogлина	16
5.2.2 ALK1	18
5.3 HHT1 y HHT2. Bases patofisiológicas	19
5.4 Tratamiento en la HHT	21
5.4.1 Estrógenos	22
5.4.1.1 Raloxifeno	22
5.4.1.2 Estriol	25
5.4.2 Fitoestrógenos	25
5.4.2.1 Genisteína	26
5.4.2.2 Resveratrol	26
5.4.3 Antioxidantes	27
5.4.3.1 N-acetilcisteína	28
5.4.4 Betabloqueantes	28
5.4.4.1 Propranolol	29
5.4.5 Inmunosupresores	30
5.4.5.1 Tacrolimus (FK506)	30
II. OBJETIVOS	33
III. MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Cultivos celulares	39
1.1 Tratamientos con la citoquina TGF- β 1	39
1.2 Tratamientos con fármacos	40
2. Transfecciones y Ensayos de luciferasa	40
3. Análisis de expresión de ARN	41

3.1	PCR cuantitativa a tiempo real	41
4.	Análisis de expresión de proteínas	42
4.1	Citometría de flujo.....	42
4.2	Western blot	43
4.3	Microscopía de inmunofluorescencia	44
5.	Ensayo de proliferación celular MTT.....	45
6.	Ensayo de actividad gelatinasa o Zimografía.....	46
7.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	46
8.	Ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA)	47
9.	Ensayos de migración y angiogénesis	48
9.1	Ensayo de reparación de herida o <i>Wound Healing</i>	48
9.2	Ensayo de formación de tubos sobre matrigel	49
10.	Análisis estadístico	49
IV.	RESULTADOS	51
1.	Estrategia basada en la estimulación de la expresión de ENG y/o ALK1	53
1.1	Raloxifeno	53
1.1.1	Los niveles de expresión de ENG y ALK1 aumentan en células endoteliales	53
1.1.2	La actividad transcripcional del promotor de ENG y ALK1 aumenta	55
1.1.3	RE α se une al promotor de ENG asociándose con Sp1.....	56
1.1.4	Raloxifeno promueve la migración y la formación de tubos	57
1.2	Estriol	59
1.2.1	La expresión de ENG aumenta en HMEC-1 a dosis bajas de Estriol	59
1.2.2	Estriol disminuye la migración de células HUVEC	60
1.2.3	La formación de tubos se reduce a dosis altas de Estriol	60
1.3	FK506.....	63
1.3.1	Aumento de la expresión de ENG y ALK1 en la membrana de células HMEC-1	63
1.3.2	FK506 aumenta los niveles de ARNm de ENG y ALK1 activando la expresión de ambos promotores	63
1.3.3	La señalización de TGF- β 1 en células endoteliales es modulada por FK506	64

1.3.4	La fosforilación de Smad1 y la traslocación de Smad4 al núcleo aumentan tras tratamiento de FK506	65
1.3.5	FK506 modula la unión de Smad4 a los promotores de <i>Id1</i> y <i>PAI-1</i>	68
1.3.6	Aumento de la unión del complejo Sp1/Smad4 a la región proximal del promotor de ENG	68
1.3.7	FKBP12 colocaliza y coprecipita con ALK1	70
1.3.8	FK506 aumenta la migración celular en ensayos de reparación de herida en HMEC-1	71
1.3.9	FK506 aumenta la formación de tubos en células HMEC-1	71
1.4	N-acetilcisteína	73
1.4.1	El tratamiento con N-acetilcisteína aumenta los niveles de ENG y disminuye los de ALK1	73
1.4.2	La señalización de la vía de NF- κ B disminuye tras tratamiento con N-acetilcisteína	74
1.4.3	N-acetilcisteína no promueve cambios en los ensayos de cierre de herida ni tubulogénesis	75
2.	Estrategia basada en la normalización de la vasculatura mediante fármacos antiangiogénicos	77
2.1	Genisteína	77
2.1.1	La velocidad de migración y la formación de tubos disminuyen	77
2.1.2	Los tratamientos con Genisteína aumentan la expresión de ENG y ALK1 en células HMEC-1	78
2.2	Resveratrol	79
2.2.1	Disminución de la migración celular y la tubulogénesis	79
2.2.2	Aumento en los niveles de ALK1 en la superficie de células HMEC-1	81
2.3	Propranolol	81
2.3.1	Disminución de la migración celular y la tubulogénesis	82
2.3.2	La expresión de las proteínas angiogénicas Endoglina y ALK1 y sus ARNm disminuyen en células HMEC-1	84
2.3.3	Propranolol disminuye la expresión de PAI-1, promoviendo el proceso de la fibrinólisis en HMEC-1	86
2.3.4	Tratamientos largos con Propranolol desencadenan el proceso de apoptosis en células HMEC-1	87

2.3.5	Las células EOMA son más sensibles al tratamiento con Propranolol que células HMEC-1/HUVEC	89
2.3.6	HUVECs procedentes de cordón umbilical HHT muestran una migración y formación de tubos menor con tratamiento de Propranolol, que HUVECs sanas	93
V. DISCUSIÓN	95
1.	Búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento en HHT.....	97
1.1	Compensación de la haploinsuficiencia como mejora del proceso angiogénico	100
1.1.1	Raloxifeno, primer medicamento huérfano en HHT	100
1.1.2	Estriol incrementa la resistencia del epitelio nasal y aumenta la expresión de ENG	102
1.1.3	FK506, inmunosupresor de elección en trasplantes de HHT..	103
1.1.4	N-acetilcisteína mejora la función de Endoglina	105
1.2	Normalización de la angiogénesis y formación de una nueva red vascular	109
1.2.1	Papel dual del fitoestrógeno Genisteína	109
1.2.2	Resveratrol como antiangiogénico.....	110
1.2.3	Propranolol, nuevo candidato para el tratamiento local de las epistaxis	111
VI. CONCLUSIONES	115
VII. BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXOS	137

RESUMEN

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) es una enfermedad vascular autosómica dominante caracterizada por aparición de hemorragias nasales recurrentes (epistaxias), manchas cutáneas de color púrpura (telangiectasias) y malformaciones arterio-venosas en órganos internos. Es considerada una enfermedad rara con una prevalencia de 1/5.000-1/8.000. La HHT está causada, en un 90% de los casos, por mutaciones en los genes *Endoglin* y *ALK1*, originando HHT1 y HHT2 respectivamente. Ambas proteínas son componentes del complejo receptor del TGF- β , expresadas fundamentalmente en células endoteliales, e implicadas de una manera importante en Angiogénesis. La disminución de los niveles de estas proteínas conlleva a una señalización defectuosa de TGF- β , alterando la expresión de numerosos genes diana y sus funciones, ocasionando una pérdida de la red capilar, dando lugar a una dilatación del vaso y como consecuencia una mezcla de sangre arterial y venosa. En la actualidad no existe curación de la HHT, existiendo medidas paliativas que ayudan a mejorar la calidad de vida. En el presente trabajo se ha buscado fármacos que de una manera u otra puedan disminuir la sintomatología de la HHT. Por un lado se han ensayado fármacos para compensar la haploinsuficiencia de *Endoglin* y/o *ALK1* en los pacientes para una mejora de la señalización de TGF- β encontrando que, compuestos como Raloxifeno, Estriol, N-acetilcisteína o Tacrolimus aumentan la expresión de uno de los dos genes o de ambos. También se ha realizado el estudio de fármacos antiangiogénicos que puedan disminuir la vasculatura anormal de los pacientes como Genisteína, Resveratrol o Propranolol, disminuyendo éstos la Tubulogénesis *in vitro*, o la migración celular necesaria en la angiogénesis. Con fármacos que cumplieran estos requisitos se detendría la progresión de las telangiectasias en la mucosa nasal y gástrica y se evitarían los sangrados, bien mediante normalización de la vasculatura o bien por la inhibición de la formación de estos vasos.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Vasculogénesis y Angiogénesis

El desarrollo de una función vascular correcta es esencial para la supervivencia de todo organismo adulto y por ello el desarrollo en el embrión juega un papel tan importante, al igual que la regulación durante el resto de vida. Durante el desarrollo embrionario, la formación de nuevos vasos sanguíneos depende de dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis (Adams y Alitalo, 2007; Risau, 1997).

La vasculogénesis es la formación *de novo* de los vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario, (aunque existen diversos estudios que demuestran que también se da en el organismo adulto) (Asahara y col., 1997; Drake, 2003; Murohara y col., 2000; Shi y col., 1998). Sucede debido a la diferenciación de las células progenitoras del mesodermo llamadas hemangioblastos, en células endoteliales y en precursores de células hematopoyéticas que generarán islotes en un primer estadio y tras asociarse entre ellas formarán una red primitiva vascular. (Adams y Alitalo, 2007; Risau, 1997; Yancopoulos y col., 2000). Estos hemangioblastos proliferan, migran y se asocian para formar ese plexo primitivo, que tras las primeras diferenciaciones dará lugar a una lámina basal rodeada de pericitos externamente y recubierta internamente por una capa de células endoteliales que rodean el lumen ocupado por las células hematopoyéticas. En este temprano proceso del desarrollo están implicados factores como FGFs, la familia de hedgehog, VEGF, Neurofilinas y TGF- β (Adams y Alitalo, 2007; Patel-Hett y D'Amore, 2011; ten Dijke y Arthur, 2007).

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos mediante extensión de otros ya existentes, debido a la proliferación y migración de las células endoteliales. Tras el establecimiento del plexo vascular primitivo, las estructuras vasculares se propagan mediante un proceso denominado angiogénesis ramificante o germinativa (*sprouting*). Posteriormente, la estructura del plexo primitivo se va modificando por la escisión o por la fusión de los vasos preexistentes, en un proceso denominado angiogénesis no ramificante (*non-sprouting* o *intussusception*) (Adams y Alitalo, 2007; Carmeliet y Jain, 2011; Klagsbrun y D'Amore, 1991). La angiogénesis ramificante

conlleva degradación proteolítica de la matriz extracelular y una proliferación simultánea de las células endoteliales.

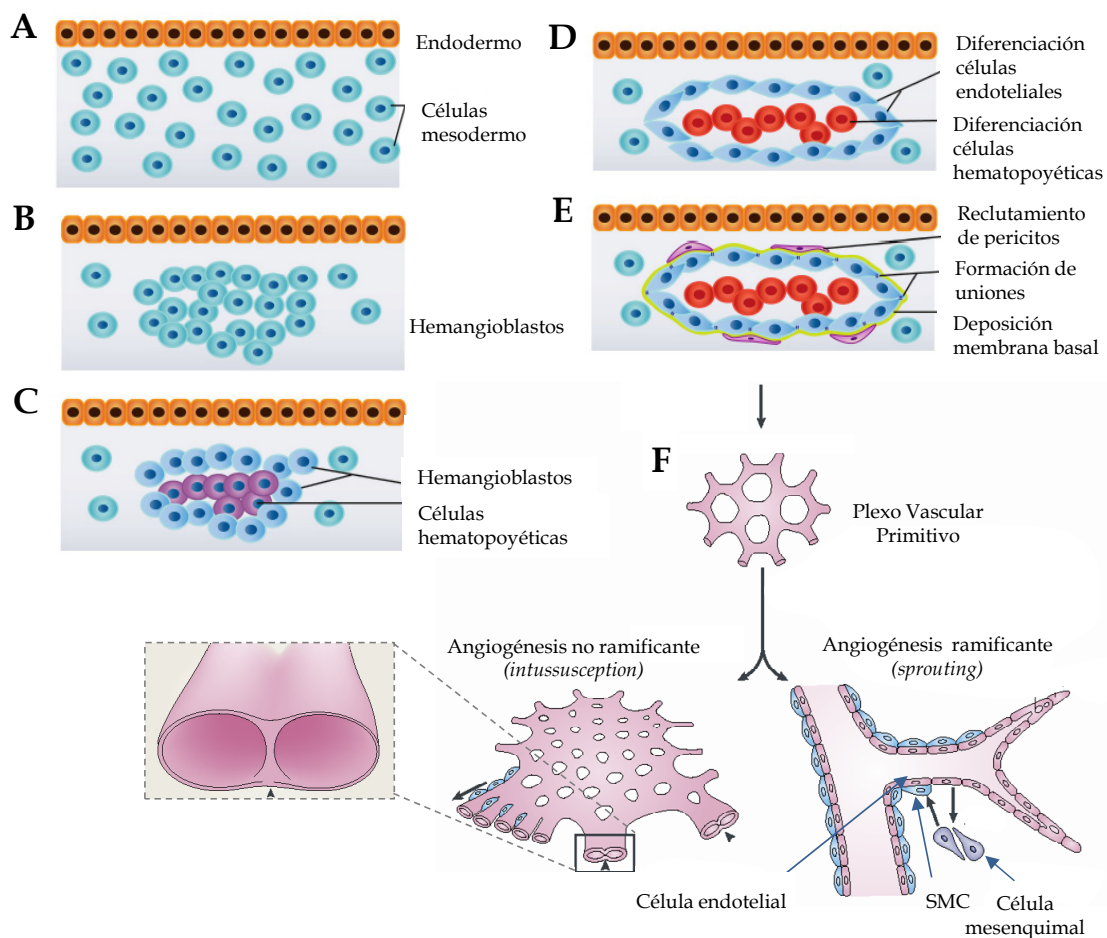


Figura 1. Vasculogénesis. A) Células del endodermo inducen a las células del mesodermo a que inicien la vasculogénesis. B) Los hemangioblastos migran y se asocian. C) Formación de los islotos, conteniendo precursores hematopoyéticos con angioblastos localizados periféricamente. D) Los angioblastos se diferencian a células endoteliales. E) Formación del lumen mediante uniones entre las células endoteliales y la membrana basal. Los pericitos se asocian a la membrana basal del endotelio, procediendo a la maduración del vaso. F) **Angiogénesis.** El plexo vascular primitivo se extiende mediante angiogénesis; que puede ser ramificante (*sprouting*) o no-ramificante (*non-sprouting* o *intussusception*) completando la maduración del endotelio, el reclutamiento por parte de las células endoteliales de células mesenquimales que se diferencian a células de la musculatura lisa o pericitos que formarán la pared vascular (Adaptado de Pattel-Hett y D'Amore, 2011 y ten Dijke y Arthur, 2007).

De este modo, el sistema circulatorio es capaz de reorganizarse según las necesidades de irrigación de un órgano en un determinado momento, siendo capaz de dar una rápida respuesta a las necesidades de oxígeno y nutrientes mediante creación de nuevos vasos a partir de los ya existentes. A veces, este proceso se vuelve perjudicial en algunas patologías de tipo tumoral, donde la terapia va dirigida a evitar la irrigación del tumor, mediante inhibición de la neoangiogénesis promovida por el

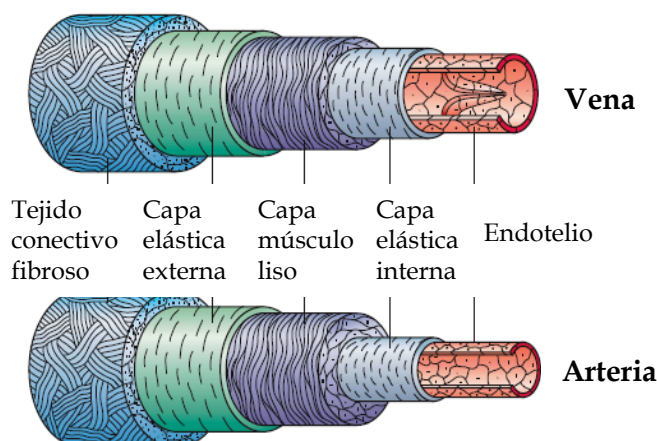
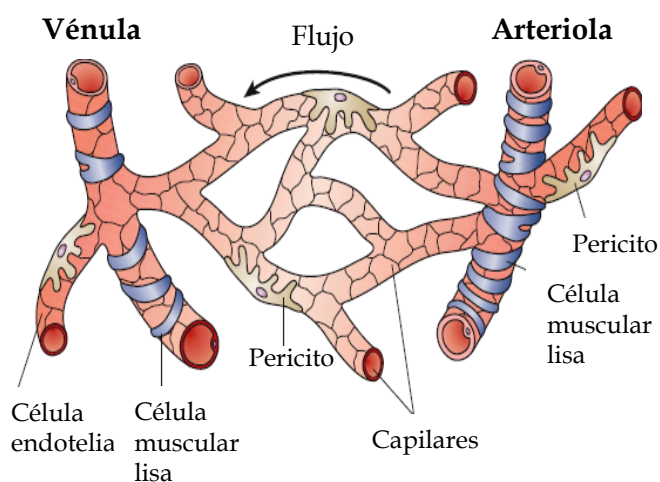
tumor siendo también una diana farmacológica en distintas patologías vasculares (Carmeliet, 2005; Carmeliet y Jain, 2000).

2. Estructura de los vasos sanguíneos y diferencias

Todas las células que componen el organismo necesitan de un aporte continuado de oxígeno y una recogida de “desechos” metabólicos, por lo que el sistema de arterias, venas y capilares se organiza a lo largo del organismo. Las arterias y las venas se expanden creciendo concéntricamente y mediante remodelación vascular, mientras que los capilares crecen mediante angiogénesis ramificante dando cada vez redes más complejas. La diferenciación arteriovenosa continúa durante el desarrollo del organismo, reflejando las distintas propiedades de cada uno de los componentes de esta red vascular. La diferencia entre la composición de los elementos vasculares proviene de las distintas propiedades funcionales de éstos. Mientras los vasos grandes como las arterias o las venas poseen múltiples capas concéntricas de células musculares lisas (VSMCs, *vascular smooth muscle cells*), colágeno y elastina, las células endoteliales de los capilares están recubiertas por una ligera capa de pericitos rodeando el endotelio en lugar de VSMCs. Ambos tipos celulares (pericitos y VSMCs) son de naturaleza mesenquimal, tienen morfología fibroblástica y se denominan células murales. Arterias y venas están formadas por la túnica íntima compuesta por el endotelio, la membrana basal y una capa elástica interna; la túnica media, formada por capas de células musculares lisas junto con fibras de colágeno, elastina y proteoglicanos; y la túnica adventicia formada por tejido conectivo acompañado por fibras de elastina y colágeno. La diferencia entre ambos vasos, arteria y venas, reside en que las venas poseen válvulas que previenen del reflujo de la sangre, mientras que las arterias tienen una capa de células musculares mayor que las venas (porque soportan menor presión) permitiendo a las arterias resistir el estrés de flujo laminar y pulsátil al que las somete la sangre (Adams y Alitalo, 2007; Cleaver y Melton, 2003).

(Página siguiente)

Figura 2. Diferenciación arteriovenosa. A) Componentes de la pared vascular de las venas: la túnica íntima endotelial formada por el endotelio y una capa elástica (con válvulas que previenen del reflujo de la sangre), túnica media muscular (formada por células musculares lisas y colágeno) y la túnica adventicia compuesta por tejido elástico y conectivo. Las capas que forman la arteria, son idénticas a las que constituyen la vena, con la diferencia de que aquí la túnica media tiene mayor grosor para soportar el flujo de la sangre. **B)** La red capilar consiste en una capa de células endoteliales rodeada en una pequeña fracción de su superficie por pericitos y células musculares lisas (Adaptado de Cleaver y Melton., 2003).

A**B**

3. El Endotelio y su función

El endotelio es la monocapa celular que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos. Es un tejido que ha dejado de considerarse como una simple barrera que contiene el plasma y a las células de la sangre y que permite el intercambio entre nutrientes y desechos entre el medio hemático y los tejidos. La exposición continua a los múltiples componentes de la sangre hace del endotelio un órgano endocrino con numerosas funciones reguladoras. De una correcta interrelación entre estos componentes sanguíneos y las células endoteliales dependen determinadas constantes o el equilibrio homeostático. Por eso la disfunción endotelial es la responsable de diversas patologías como la ceguera asociada a diabetes, artritis reumatoide, psoriasis, sepsis, síndrome urémico hemolítico (SHU), Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

(HHT), hipertensión, arterioesclerosis o trombosis (Goligorsky, 2000; Gresele y col., 2010; Jones y col., 2001), además de contribuir al mal pronóstico del cáncer. La heterogeneidad de estas células endoteliales no sólo es evidente a nivel funcional ya que el endotelio está implicado en el control de vasoconstricción y vasodilatación, la coagulación de la sangre, fibrinólisis, la extravasación leucocitaria (*homing*) y diapédesis, inflamación y reparación de heridas, pero también queda de manifiesto en la morfología, ya que el fenotipo de estos vasos puede variar según el órgano en el que se encuentren. Mientras que en el cerebro, estas células endoteliales interactúan con los podocitos de los astrocitos formando la llamada barrera hematoencefálica (BBB: *Brain Blood Barrier*) con un endotelio continuo con fuertes uniones celulares y con endocitosis y transcitosis altamente polarizadas, en el caso del hígado el endotelio es altamente fenestrado y discontinuo, forrando los sinusoides hepáticos, mediando así el intercambio de metabolitos y eliminación de las toxinas entre la sangre portal, las células de Kupffer y los hepatocitos (Cleaver y Melton, 2003; Tse y Stan, 2010).

4. Superfamilia de TGF- β en la biología endotelial

El factor de crecimiento TGF- β , forma parte de una gran familia de citoquinas relacionadas estructural y funcionalmente. Se conocen más de 40 miembros en esta familia y todos tienen en común su estructura dimérica y la presencia de un motivo estructural "*Knot cystein*" (Galat A, 2011). Podemos encontrar tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), cinco activinas, tres inhibinas, al menos dieciséis proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Govinden y Bhoola, 2003; Miyazono y col., 2009; Stenvers y col., 2010) además de la Hormona Anti Mülleriana (AMH, también llamada MIS ó Sustancia Inhibidora Mülleriana) (di Clemente y Belville, 2006), nodales, miostatinas y proteínas osteogénicas (Roberts y Sporn, 1993). La mayoría de estas citoquinas se secretan en forma de dímeros inactivos latentes, y en el caso del TGF- β , tras distintos procesos proteolíticos llevados a cabo con proteasas, elastasas, integrinas o metaloproteasas, tiene lugar su activación, pudiéndose unir a sus receptores y activar la ruta de señalización requerida (Blobe, y col., 2000; ten Dijke y Arthur, 2007; Van Meeteren y ten Dijke, 2011). Muchas de estas citoquinas juegan papeles importantes en numerosos procesos durante el desarrollo, pero también están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis del tejido y en su reparación en el adulto (Massague, 1998) así como en condiciones patológicas como, por ejemplo, la transformación

epitelio-mesenquimal que tiene lugar durante la malignización tumoral (Meulmeester y ten Dijke, 2010; Van Meeteren y ten Dijke, 2011), aterosclerosis, estenosis (Bobik, 2006) o en enfermedades vasculares como es el caso de la HHT, hipertensión pulmonar o fibrosis (Pardali y col., 2010; Santibañez y col., 2011).

La importancia de la señalización mediada por TGF- β en la biología endotelial, se puso de manifiesto tras la identificación de diversas patologías vasculares causadas por la presencia de mutaciones en los genes de los receptores de TGF- β , (Gallione y col., 2004; Johnson y col., 1996; McAllister y col., 1994) aunque también existen en la literatura reciente, mutaciones que originan cambios en la disponibilidad de isoformas activas de TGF- β en el medio extracelular, como es el caso de algunos síndromes cardiovasculares como el síndrome de Marfan y la preeclampsia (ten Dijke y Arthur, 2007). Los miembros de la familia del TGF- β llevan a cabo sus funciones a través de la unión a los receptores transmembrana tipo I y tipo II con actividad Ser/Thr-quinasa. Hay 7 tipos distintos de receptores I (ALK1-ALK7, conocidos como “*activin receptor like kinase*”) y cinco receptores tipo II (ActRIIA, ActRIIB, BMPRII, TGF β RII, y AMHRII) (Heldin y col., 1997; Schmierer y Hill, 2007; Shi y Massague, 2003). Distintos ligandos pueden unirse a distintas combinaciones de los receptores I y II, dando lugar a una señalización específica de cada ligando. El TGF- β mayoritariamente ejerce su señal mediante T β RI/ALK5 y T β RII, las activinas mediante ALK4 y ActRIIA y IIB. Los BMPs señalizan por ALK1, 2, 3 y 6 junto con BMPRII, ActRIIA y ActRIIB (Van Meeteren y ten Dijke, 2011) En las células endoteliales, el TGF- β puede señalizar, no sólo por ALK5, sino también por ALK1, ya que ambos receptores tipo I se coexpresan de modo particular en este tipo celular (Goumans y col., 2002; Oh y col., 2000).

4.1 Señalización de TGF- β

El TGF- β activo circulante se une al dímero de membrana T β RII (que está constitutivamente activado por autofosforilación en residuos Ser-Thr. El dímero T β RI es reclutado al complejo y fosforilado por T β RII en residuos Ser específicos (Massague, 1998; Wieser y col., 1995). A su vez el correceptor o modulador de la señal también llamado T β RIII (Endoglin o Betaglicano) se une a ellos y el complejo activo transduce la señal hacia el interior de la célula mediante fosforilación de las proteínas Smads reguladoras (R-Smads). Las R-Smads sin fosforilar se encuentran de manera inactiva en el citoplasma, ancladas a microtúbulos por interacción con α y β -tubulina (Dong y col.,

2000). Las R-Smads se dividen en dos grupos, según quien las active. Smad1, 5 y 8 son fosforiladas por ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6, y Smad2 y 3, son fosforiladas por ALK4, ALK5 y ALK7. Cada R-Smad está formada por dominios conservados en la región N-terminal y C-terminal denominados MH1 y MH2. MH1 se unirá al ADN y otras proteínas, mientras que MH2 se encarga de homodimerizar o heterodimerizar con otras Smads (Massague y col., 2005). Las R-Smads activadas forman un complejo con la Smad cooperadora (co-Smad), que en mamíferos es Smad4, y se translocan al núcleo, donde regulan, junto con otros factores, la transcripción de genes específicos, entre los que se encuentran Smad6 y 7, identificadas como las Smad inhibitorias (I-Smad), que se unen a los receptores tipo I compitiendo así con la unión de las R-Smad e impidiendo su fosforilación y consecuente activación. También inhiben la activación de las R-Smad mediante reclutamiento de fosfatasa y ubiquitin ligasa específicas para el complejo receptor activado, para defosforilarlo o degradarlo en el proteosoma (Heldin y col., 1997; Itoh y ten Dijke, 2007; Schmierer y Hill, 2007; Shi y Massague, 2003; Valdimarsdottir y col., 2006).

Las Smads interaccionan con coactivadores como el CBP/p300 o correpresores como Sno permitiendo al complejo activar o reprimir la transcripción de ciertos genes diana. (Derynck y Zhang, 2003; Wotton y Massague, 2001). Estos complejos activadores o represores se unirán a secuencias específicas en el ADN, que son reconocidas por las Smads y se denominan SBE (*Smad-binding elements*) y su secuencia es el palíndromo de 8 pb 5'-GTCTAGAC-3' (Zawel y col., 1998, Massague, 2005). Los promotores que responden a TGF- β contienen uno o más sitios SBE. Aumentando exponencialmente la afinidad por la secuencia cuando los sitios SBE se encuentran en tándem (Shi y col., 1998). El sitio SBE específico de unión de Smad3 al ADN se denomina secuencia CAGA y corresponde al consenso 5'-AG(C/A)CAGACA-3' (Dennler y col., 1998). Las Smads son consideradas como las proteínas específicamente transductoras de la señal del TGF- β , aunque pueden establecer reacciones cruzadas con rutas de señalización mediadas por otros ligandos.

No obstante, la señalización tanto de TGF- β como de BMPs también puede activar rutas en las que los factores de transcripción Smad no están presentes, existiendo lo que se denominan respuestas "no-Smad". Dentro de estas respuestas se incluyen las mediadas por la ruta de MAPKs (*Mitogen activated protein kinases*), las mediadas por GTPasas similares a Rho, por la ruta de PI3K/AKT y por TAK1 (*TGF- β Activated Kinase 1*) (Moustakas y Heldin, 2005; Mu y col., 2011; Zhang, 2009). Las señales nucleares

transmitidas por estas vías de señalización pueden regular la transcripción en un modo independiente de las Smads o bien actuando sinérgicamente con ellas.

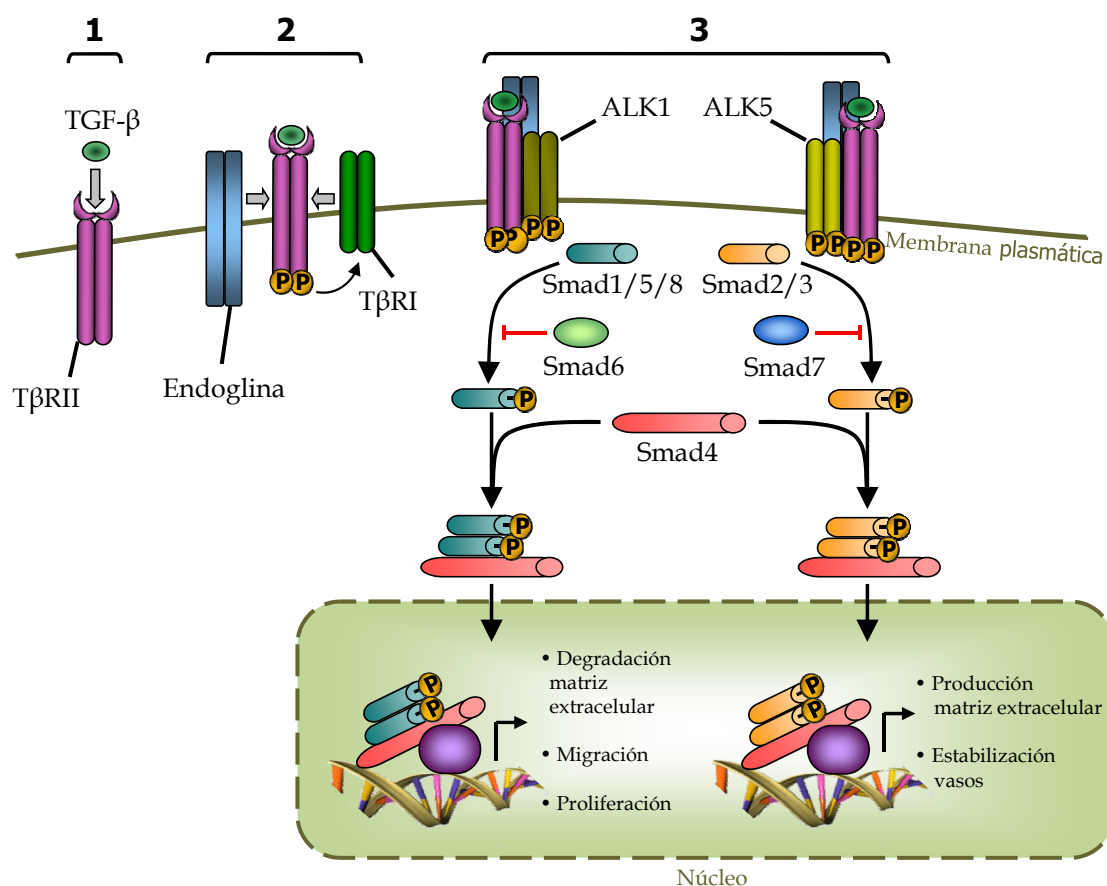
Los moduladores o correceptores de la señal también llamados T β RIII, son receptores que no señalizan ya que no tienen dominio quinasa. En la señalización de TGF- β han sido identificados dos: Betaglicano y Endoglin. Ambos tienen una pequeña porción intracelular y un gran dominio extracelular, presentando un 70% de homología en sus regiones transmembrana y citoplásmica, siendo escasa la homología en la región extracelular (Gougos y Letarte, 1990; Letamendia y col., 1998, Lopez-Casillas y col., 1991). Pueden coexistir en células endoteliales pudiendo formar un complejo entre ambos y el complejo receptor de TGF- β .

4.2 Señalización TGF- β en células endoteliales

En células endoteliales existen dos tipos de T β RI para TGF- β , permitiendo que éste pueda activar diferencialmente; ALK1 y ALK5. ALK5 se expresa en la mayoría de los tipos celulares mientras que ALK1 es específico de células endoteliales (Goumans y col., 2003a; Goumans y col., 2003b; Goumans y col., 2002; Lebrin y col., 2005). Endoglin, por su parte, interacciona con ambos receptores tipo 1 y actúa estimulando la vía de señalización de ALK1 e inhibiendo la de ALK5, aunque el mecanismo molecular subyacente no se conoce con exactitud (Blanco y col., 2005; Lebrin y col., 2005; Lebrin y col., 2004; Santibañez y col., 2007).

(Página siguiente)

Figura 3. Señalización TGF- β en células endoteliales. Cuando el ligando TGF- β se une a T β RII, transmite la señal al T β RI y recluta al receptor auxiliar o modulador de la señal, Endoglin. T β RI se fosforila, formándose el complejo receptor de TGF- β . En las células endoteliales existen dos tipos distintos de complejos receptores según el T β RI que lo forme; ALK1 o ALK5. Cuando el dímero de ALK1 se fosforila, éste fosforila a su vez a los factores de transcripción Smad1/5/8 que tras unirse a Smad4 y traslocarse al núcleo, se asocian a la maquinaria de transcripción (MT) y promoverán la expresión de genes implicados en la activación de la angiogénesis, mientras que si se fosforila ALK5, se activará la expresión de genes implicados en la resolución de los vasos, promovido por las Smad2/3. El TGF- β regula el estado del endotelio mediante un equilibrio entre ambas rutas de señalización. La relación entre ellas determinará si el TGF- β tiene un efecto proangiogénico o antiangiogénico (Adaptado de ten Dijke y Arthur, 2011).



4.3 Estado de activación-resolución del endotelio

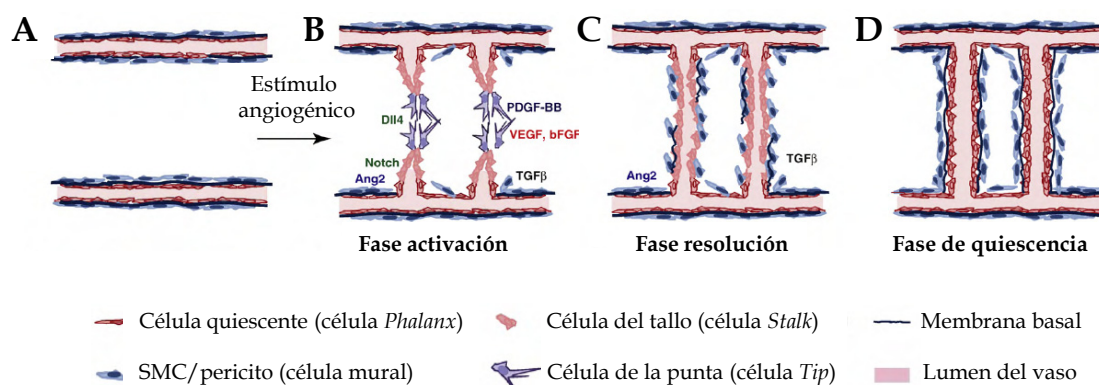
El TGF- β presenta un papel dual en la angiogénesis, ya que, en función de los requerimientos del organismo, favorece la formación de nuevos vasos o su resolución. (Pepper, 1997). Esta dualidad se puede explicar teniendo en cuenta la existencia de los dos receptores tipo I, ALK1 y ALK5 (Goumans y col., 2002, Goumans y col., 2003a). La activación de la vía de señalización de ALK1 inducida por la fosforilación de Smad1/5/8, desencadena la activación de genes diana entre los que se encuentran genes implicados en procesos de proliferación y también otros que capaces de frenar la ruta como las Smad inhibitoras (Lux y col., 2006; Ota y col., 2002). Además de promover la migración y formación de tubos, Id1 (uno de los principales genes regulados por ALK1) inhibe la diferenciación y activa la acción de metaloproteasas que degradan matriz extracelular para favorecer la ramificación de los nuevos vasos en formación (Goumans y col., 2002; ten Dijke y col., 2003). ALK1 está considerado como mediador de estímulos proliferativos favoreciendo la fase de activación de

angiogénesis, que implica un incremento en la permeabilidad vascular, degradación de la membrana basal y proliferación y migración de las células endoteliales para poder formar los nuevos vasos. Por el contrario, la interacción del TGF- β con ALK5 induce la fosforilación de Smad2/3, inhibiendo la proliferación y migración de las células endoteliales, promoviendo la reconstitución de la membrana basal y el reclutamiento de pericitos y células del músculo liso, necesario para la resolución de la angiogénesis y la estabilización de los nuevos vasos (Blanco y col., 2005; Goumans y col., 2003a; Goumans y col., 2003b; Goumans y col., 2002). ALK5 induce la expresión de fibronectina (*FN1*) y del inhibidor tipo 1 del activador de plasminógeno (*PAI-1*), un regulador negativo de la migración endotelial (Boehm y col., 1999). El endotelio se mantiene en un estado quiescente, parando el ciclo celular, y llevando a la célula a un estado de diferenciación en la fase de maduración de la angiogénesis, con la formación de nueva matriz extracelular alrededor del nuevo vaso formado para su estabilización.

Mientras que ALK1 en el desarrollo embrionario de ratón, se expresa predominantemente en el endotelio arterial, ALK5 se localiza en las tunicas media y adventicia de los vasos, formadas por células musculares lisas y pericitos, pero es indetectable en la túnica íntima o endotelio propiamente dicho (Seki y col., 2006). En estado adulto ambas cascadas de señalización siempre se encuentran en un balance finamente controlado. Se considera que los efectos opuestos de ALK1 y ALK5 dependen estrictamente de la dosis y duración de la estimulación por el TGF- β . Dosis bajas y duración corta del estímulo estarían relacionadas con la primera fase y dosis altas y mayor duración del estímulo con la segunda fase (Lebrin y col., 2004).

(Página siguiente)

Figura 4. Bases moleculares de la Angiogénesis. La Angiogénesis se inicia por señales angiogénicas de hipoxia o daño (VEGF, bFGF, o TGF- β) y consta de dos fases. Al comenzar la fase de activación de la angiogénesis, los pericitos se liberan de la membrana basal por degradación proteolítica mediada por metaloproteasas, y las células endoteliales pierden sus uniones dando lugar a una dilatación del vaso. Éstas migran hacia la matriz extracelular y para evitar que esta migración sea en masa hacia la señal angiogénica, solo una célula endotelial, denominada célula de la punta (*tip cell*) que no prolifera, es la elegida para liderar el proceso. La siguen en el avance las células del tallo (*stalk*), que sí que proliferan y forman el lumen del nuevo vaso, reclutando a las células murales y dando paso a la fase de resolución/quiescencia de la angiogénesis. Finalmente, el contacto entre dos células de la punta será la señal para que esas dos ramificaciones de vasos ya existentes se unan y se unifiquen con un único lumen, adquiriendo un fenotipo quiescente. (Adaptado de Pardali y col., 2010).



5. Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) o Síndrome de Rendu Osler Weber

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) o Síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad vascular autosómica dominante que se caracteriza por la aparición de estructuras vasculares anormales en la región de contacto entre vénulas y arteriolas, dentro de la red capilar, lo que lleva a su desestructuración y pérdida de funcionalidad. Esta irregularidad en la vasculatura da lugar a frecuentes hemorragias nasales, telangiectasias y malformaciones arterio-venosas viscerales (AVMs) (Guttmacher y col., 1995; Shovlin, 2010; Shovlin y Letarte, 1999). La prevalencia media de la HHT se halla en torno a 1/5.000-1/8.000, siendo mayor en determinadas regiones como la isla de Funen en Dinamarca, la región de Jura en Francia, o la isla de Bonaire en las Antillas Holandesas (Kjeldsen y col., 1999; Plauchu y col., 1989; Shovlin y Letarte, 1999). La enfermedad fue descrita por primera vez por Henry Gawen Sutton, a mediados del siglo XIX (Sutton, 1864). Henri Rendu, años después, la reconoce como una enfermedad hemorrágica distinta de la hemofilia (Rendu, 1896). Posteriormente, a inicios del siglo XX, William Bart Osler (Osler, 1901) y Frederick Parks Weber (Weber, 1907) publican las primeras series de casos, aunque es Hanes (Hanes, 1909) quien le da el nombre de Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. En 1986 es inscrita en la base de datos de la OMIM (*On Line Mendelian Inheritance in Man*; OMIM 187300) (Faughman y col., 2011).

5.1 Manifestaciones clínicas

La HHT es una enfermedad cuya sintomatología no es la misma entre afectados de una misma familia y mucho menos entre familias distintas. En un principio fue

considerada una enfermedad que sólo cursaba con sangrados nasales y gastrointestinales pero en la década de los 40 se observó que había pacientes que mostraban malformaciones arteriovenosas en pulmón, cerebro e hígado, siendo hoy en día una manifestación presente en un alto porcentaje de los pacientes. Esta enfermedad se diagnostica a nivel clínico, existiendo 4 criterios consenso que fueron definidos por el comité asesor científico de la Fundación Internacional de HHT en la isla de Curaçao en 1999, conocidos como los Criterios de Curaçao (Shovlin y col., 2000). Un individuo se considera enfermo de HHT si presenta tres de estos criterios:

1. Telangiectasias o pequeñas dilataciones anormales de los vasos sanguíneos que se observan como manchas rojas en piel y mucosas. Principalmente son visibles en manos, labios, lengua, uñas y tracto digestivo. Suelen aparecer en la tercera década de vida y pueden llegar a sangrar.
2. Epistaxias o sangrados nasales debido a la rotura de estas mismas telangiectasias ante la frecuente erosión de la mucosa nasal. Los sangrados suelen ser espontáneos y recurrentes siendo el síntoma más frecuente en los pacientes, el primero en aparecer ya que lo hace en la primera década de vida. Suelen aumentar en frecuencia e intensidad con el incremento de la edad. No todos los pacientes experimentan la misma cantidad ni duración de sangrado, ya que algunos presentan epistaxias leves y rápidas y otros abundantes y duraderas que provocan anemias considerables con necesidad de transfusiones sanguíneas (Plauchu y col., 1989).
3. Malformaciones arteriovenosas en órganos internos como pulmón, hígado o cerebro. Son dilataciones postcapilares que dan lugar a una mezcla de sangre arterial y venosa y que pueden romperse provocando hemorragias (Guttmacher y col., 1995). Pueden estar presentes desde el nacimiento. Las fístulas arteriovenosas pulmonares aparecen en un 15-35% de los pacientes, pueden dar lugar a cianosis o hipoxia o suprimir el papel de filtro de la barrera pulmonar, haciendo así posible el paso de microorganismos, con el riesgo de que lleguen al cerebro y provoquen abscesos cerebrales con isquemia (Moussouttas y col., 2000). Un alto porcentaje de pacientes padecen malformaciones hepáticas (70%) (Larson, 2003). Suelen ser asintomáticas y no alterar la función hepática, pero pueden conllevar a la aparición de insuficiencia cardíaca o hipertensión. Entre el 10-25% de los enfermos de HHT tiene fístulas en el sistema nervioso, que son

las responsables de cefaleas, epilepsias, isquemias o hemorragias (Fulbright y col., 1998; Maher y col., 2001). Aunque la frecuencia de manifestaciones en otros órganos es muy baja, se han descrito casos de malformaciones arterio-venosas en la retina (Vase y Vase, 1979), ovarios, bazo, riñón y ganglios linfáticos (Reyes-Mujica y col., 1988).

4. Historia familiar de la enfermedad. Han de existir miembros de la familia en primer grado con síntomas, ya que es una enfermedad hereditaria con herencia autosómica dominante.

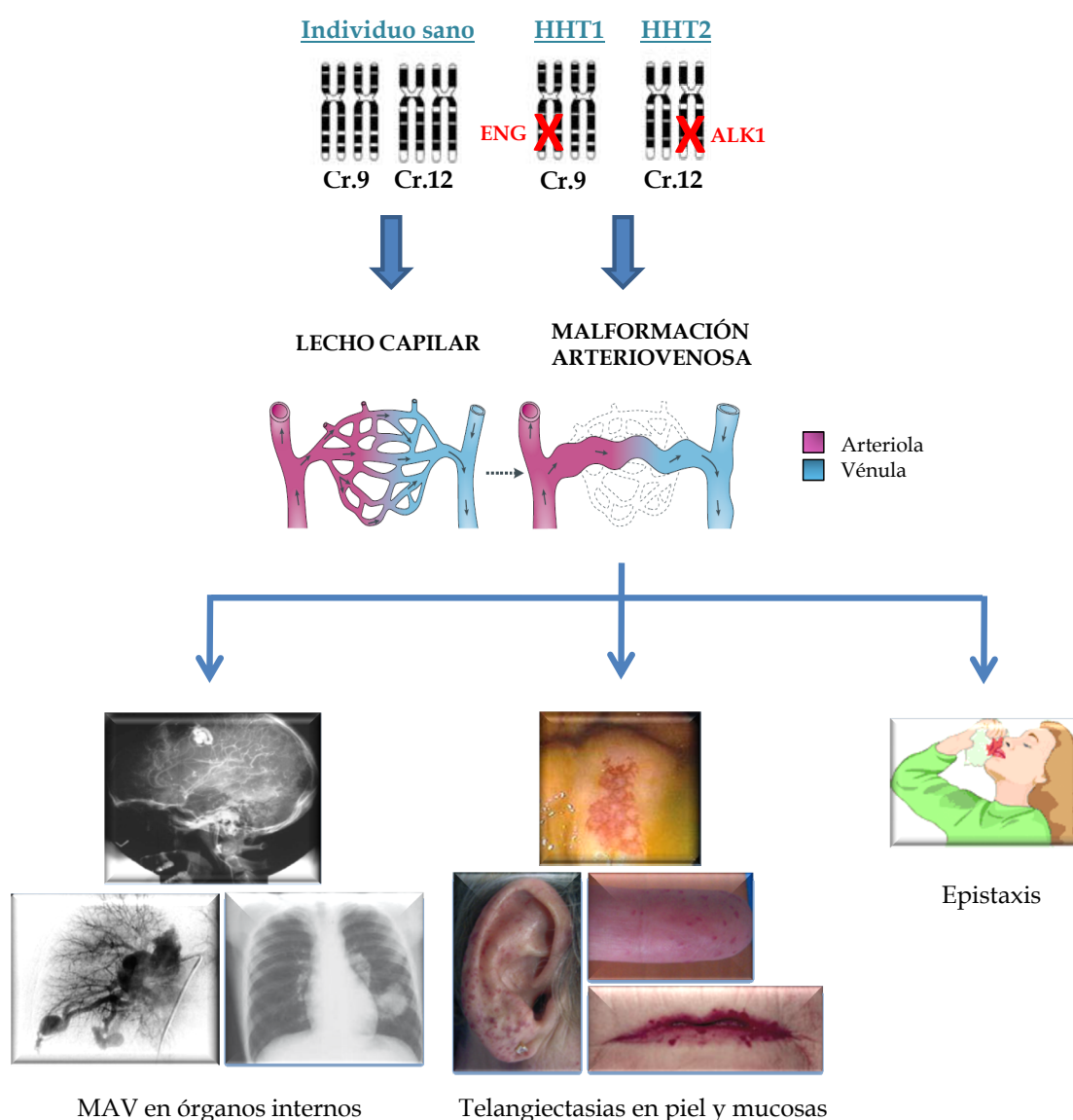


Figura 5. Sintomatología HHT. En la HHT, debido a las mutaciones en *ENG* o *ALK1*, existe una pérdida de red capilar, produciéndose una conexión directa arteriola-vénula, que da lugar a mezcla de sangre arterial y venosa. Estas malformaciones arterio-venosas pueden encontrarse en piel y mucosas, dando lugar a las telangiectasias, que si se encuentran en la mucosa nasal van a provocar los sangrados que tanto disminuyen la calidad de vida de los pacientes o si se encuentran en órganos internos pueden provocar fístulas.

5.2 Base genética

Aunque los primeros casos de HHT fueron descritos hace más de cien años no fue hasta 1994 cuando se demostró que la HHT está causada por mutaciones en al menos dos genes implicados en la vía de señalización de TGF- β . El primer gen donde se encontró mutación en pacientes de HHT se localizó, en el cromosoma 9 en la región q33-34 correspondiente a *Endoglin* (Fernandez-Ruiz y col., 1993; McDonald y col., 1994; Shovlin y col., 1994). Fueron McAllister y colaboradores quienes demostraron finalmente que mutaciones en *Endoglin* daban lugar a la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Sin embargo, existían pacientes de HHT que no presentaban mutación en *Endoglin* (McAllister y col., 1994) por lo que la búsqueda de un segundo locus llevó a descubrir mutaciones en la región 12q11-q14 del cromosoma 12, donde se localiza el gen de ALK1 (*ACVRL1*) (Johnson y col., 1995; Vincent y col., 1995). La existencia de mutaciones en estos dos genes dio lugar a la nomenclatura de HHT1 para mutaciones en *Endoglin* (OMIM 131195) y HHT2 para mutaciones en *ALK1* (OMIM 600376).

Al encontrar pacientes con características clínicas de HHT sin mutaciones en los genes de *Endoglin* o *ALK1*, se sugirió la existencia de otros genes causantes de la enfermedad, siendo descubiertos un tercer y cuarto locus situados, respectivamente, en las regiones 5q31.3-5q32 (Cole y col., 2005) y 7p14 (Bayrak-Toydemir y col., 2006), que serían responsables de la HHT3 y HHT4 respectivamente, aunque los genes afectados aún no se conocen. También se han identificado mutaciones en el gen *BMPRII* (*Bone morphogenetic protein receptor II*) que dan lugar a Hipertensión Pulmonar Primaria (PPH) con un fenotipo similar a la HHT (Abdalla y col., 2004) o que mutaciones en *Smad4/MADH4* son responsables de un síndrome combinado de Poliposis Juvenil y HHT (Gallione y col., 2006; Gallione y col., 2004). El factor común a estos distintos *loci* mutados en pacientes con síntomas de HHT es su papel funcional, puesto que todos ellos son componentes de la vía de señalización de TGF- β .

5.2.1 Endoglin

Este modulador/correceptor tipo III de la vía de señalización de TGF- β es la proteína mutada en los pacientes HHT1. Se expresa fundamentalmente en células endoteliales (Bourdeau y col., 2000a; Cheifetz y col., 1992; Ma y col., 2000). Su expresión se ve aumentada en estas células en zonas donde se está produciendo una

angiogénesis activa (Fonsatti y col., 2003) o en zonas donde hay una lesión vascular (Botella y col., 2002; Ma y col., 2000; Wang y col., 1995). Sin embargo, también podemos encontrarla en fibroblastos del estroma perivascular (Matsubara y col., 2000), en células de músculo liso vascular (Adam y col., 1998) o en el proceso de diferenciación de monocito a macrófago (Lastres y col., 1992; O'Connell y col., 1992; Sanz-Rodriguez y col., 2004a).

Endoglina es una glicoproteína homodimérica transmembrana tipo I. En su región intracelular contiene un dominio de unión PDZ, importante en la regulación de su fosforilación por parte de los receptores tipo I y II (Guerrero-Esteo y col., 2002; Lastres y col., 1994; ten Dijke y col., 2008). En su dominio extracelular, Endoglina presenta el tripéptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), el cual se postula que se encuentra implicado en adhesión celular (Cheifetz y col., 1992; Gougos y Letarte, 1990). También en la región extracelular se encuentra el dominio ZP (zona pelúcida), que caracteriza a las proteínas que lo poseen por cortarse proteolíticamente por la zona extracelular (Llorca y col., 2007). Endoglina soluble, que se produce por un corte proteolítico por la metaloproteasa MMP-MT1 (Hawinkels y col., 2010), antagoniza la función de la Endoglina en membrana. Los niveles de Endoglina soluble en plasma, se encuentran aumentados en ciertas patologías como cáncer de mama por lo que se han propuesto como un importante marcador pronóstico (Bernabeu y col., 2009; Li y col., 2000) y también en preeclampsia (enfermedad hipertensiva del embarazo) dónde se encuentra en niveles aumentados en el suero.

Se han descrito dos isoformas distintas de Endoglina (L, large; S, small) con capacidad de unir TGF- β , que se diferencian en la composición de aminoácidos de sus colas citoplásmicas. Estudios en ratón sugieren que Endoglina S puede comportarse como una molécula antiangiogénica, contrariamente a la función proangiogénica que desempeña la isoforma mayoritaria L (Blanco y col., 2008; Perez-Gomez y col., 2005). Endoglina se expresa altamente en los vasos de los tumores, por lo que desempeña un papel importante en la progresión, influyendo sobre la proliferación, la migración, invasividad y tumorigenicidad. Por esta razón Endoglina es considerada una diana molecular en el diagnóstico y terapia de algunos tumores (Bernabeu y col., 2009; Perez-Gomez y col., 2010).

Se ha propuesto que Endoglina debe desempeñar funciones independientes de esta vía de señalización, ya que en la superficie de la célula endotelial (CE) existen 100 veces más moléculas de Endoglina que complejos receptores de TGF- β (Cheifetz y col.,

1992; Qu y col., 1998) sugiriéndose un papel en la morfología celular (Guerrero-Esteo y col., 1999). Endoglina dirige la localización de la proteína de citoesqueleto ZRP1, y con ella la de las fibras de estrés. Las células que expresan Endoglina, como las células endoteliales, muestran un citoesqueleto muy bien organizado, con un gran número de fibras de actina que definen el contorno de la célula, aunque se desconoce aún el mecanismo por el cual ZRP1 modula la organización del citoesqueleto de actina (Sanz-Rodríguez y col., 2004b).

5.2.2 ALK1

Este T β RI es la proteína mutada en los pacientes HHT2 y pertenece al grupo de los receptores transmembrana tipo I, serina/treonina quinasas. La expresión de ALK1 se halló primero en tejidos altamente vascularizados como son el pulmón, la placenta y el corazón (Johnson y col., 1996), si bien más tarde se detectó su expresión en otras localizaciones celulares. Aunque no estuviera considerada como una proteína específica de endotelio, en el año 2006, Andreas Lux y colaboradores demostraron en un ensayo de expresión diferencial, que al infectar células endoteliales HMEC-1 y HUVEC con un receptor ALK1 constitutivamente activado (por mutación en sus dominios quinasa) todos los genes que se modificaban estaban implicados en angiogénesis (Lux y col., 2006). Estos resultados pusieron de manifiesto la importancia de ALK1 en la célula endotelial. Su expresión en endotelio se da principalmente en las arterias durante el desarrollo embrionario y durante las etapas de crecimiento postnatal, y esta expresión se induce en las arterias nacientes y en remodelación en el ratón adulto durante el proceso angiogénico tras un daño vascular o por tumorigénesis (Seki y col., 2003).

ALK1 es capaz de unir TGF- β 1 y activinas en presencia tanto del receptor tipo II de TGF- β (T β R-II) como del receptor tipo II de activinas (ActRII) (Song y col., 1999). Recientemente se ha descrito que dos ligandos solubles distintos de la superfamilia del TGF- β : BMP9 y BMP10, implicados en migración y crecimiento celular, son ligandos que presentan una mayor afinidad por ALK1, induciendo una respuesta específica y sostenida en el tiempo (David y col., 2007; Scharpfenecker y col., 2007). Existen evidencias de que ALK1 se expresa en la célula como monómero y que forma homodímeros cuando es reclutado en el complejo receptor de TGF- β (Yamashita y col., 1994). El monómero de ALK1 está formado por una región extracelular rica en

cisteínas, un dominio transmembrana y la región intracelular compuesta por un dominio rico en glicina y serina (GS), el cual regula la activación del receptor, y un dominio serina treonina quinasa compuesto por 11 subdominios (Abdalla y col., 2003; Lebrin y col., 2005).

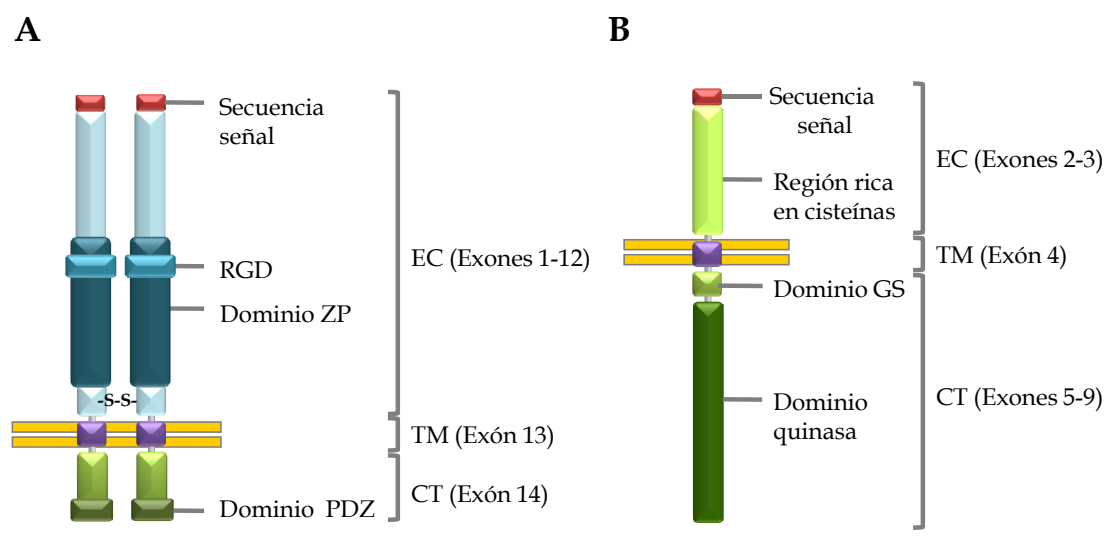


Figura 6. A) Representación esquemática del dímero de Endoglin. EC, región extracelular; TM, región transmembrana; CT, región citoplásmica; ZP, zona pelúcida. **B)** Representación esquemática del monómero de ALK1. EC, región extracelular; TM, región transmembrana; CT, región citoplásmica; Dominio GS, dominio rico en glicina y serina.

5.3 HHT1 y HHT2. Bases patofisiológicas

El 90% de los pacientes diagnosticados de HHT, son HHT1 o HHT2, por lo que el resto de mutaciones encontradas son minoritarias. Ambos tipos de HHT se consideran clínicamente indistinguibles (Shovlin y col., 2000) y el predominio de uno u otro tipo de HHT está relacionado con la localización geográfica, siendo HHT1 más frecuente en Norteamérica, Canadá (Abdalla y col., 2000; Abdalla y col., 2003) o en el norte de Europa (Letteboer y col., 2005), mientras que HHT2 prevalece en países mediterráneos como Italia (Lastella y col., 2003; Olivieri y col., 2002), Francia (Lesca y col., 2004) o España (Fernandez-L y col., 2006). Hasta el momento se han descrito más de 600 mutaciones en los genes de *Endoglin* y *ALK1* (Shovlin, 2010). Todas las mutaciones encontradas en *Endoglin* se encuentran en los 12 primeros exones que codificarán la región extracelular de la proteína, habiéndose encontrado sólo tres en la región transmembrana (exón 13) afectando una de estas mutaciones a la región citoplásmica

(exón 14). En el caso de *ALK1* se han encontrado mutaciones en todos los exones que componen el gen.

Se considera que el mecanismo molecular causante de la enfermedad es la haploinsuficiencia. Independientemente del tipo de mutación, el alelo mutado no dará lugar a una proteína funcional. De esta forma, las células endoteliales de los enfermos cuentan únicamente con la mitad de proteína, y la proteína producida por una sola copia del gen no es suficiente para garantizar una función normal (Marchuk, 1998; Shovlin y col., 1997). La HHT se manifiesta en heterocigosis para el gen afectado, ya que la situación homocigótica es letal, como se demuestra en los ratones modificados genéticamente para anular la expresión de ambos alelos de *ENG* o *ACVRL1*, que mueren entre los días 10,5-11,5 de gestación. En el caso de *ENG* es debido a defectos angiogénicos en el saco vitelino y cardiovasculares en la formación de las válvulas del corazón (Arthur y col., 2000; Bourdeau y col., 1999; Bourdeau y col., 2000b; Li y col., 1999), y en el caso de *ACVRL1* a la fusión de los plexos capilares y la hiperdilatación de grandes vasos (Oh y col., 2000). Por lo tanto, la base molecular en todas las variantes de la enfermedad es un fallo en la señalización del TGF- β endotelial, que hace que el endotelio no se desarrolle con normalidad. Toda la sintomatología de la HHT deriva de la formación de malformaciones arteriovenosas que dan lugar a la pérdida localizada de la red capilar, originando una conexión directa entre arteriolas y vénulas (Abdalla y Letarte, 2006; Fernandez- L y col., 2006; Guttmacher y col., 1995).

Además, la observación de que la severidad de los síntomas, la edad de aparición de los mismos y la localización de las lesiones varían mucho entre individuos incluso de una misma familia, ha llevado a hipotetizar recientemente la necesidad de un segundo evento, además de la haploinsuficiencia, que haga aparecer la sintomatología. De hecho, el daño vascular se ha demostrado como un evento patogénico causante de la aparición de malformaciones arteriovenosas *de novo* en la vasculatura subdérmica de ratones deficientes en *ALK1* en edad adulta (Park y col., 2009). Otra causa que actuaría como un segundo evento o *hit* sería la inflamación (Mahmoud y col., 2010) o la hipoxia localizada (Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010).

5.4 Tratamiento en la HHT

En la actualidad, los pacientes HHT no tienen tratamientos que curen su enfermedad, aunque si una serie de medidas paliativas como son la embolización de las fístulas arteriovenosas (Andersen y col., 1998); la septodermoplastia o sustitución de la mucosa nasal por un injerto de piel de otra zona del cuerpo (Fiorella y col., 2004; Ichimura y col., 2006), terapias hormonales (Jameson y Cave, 2004), cauterización (Lund y Howard, 1999) o el uso de agentes antifibrinolíticos (Saba y col., 1994; Sabba y col., 2001) en el tratamiento de las epistaxias y administración de hierro o transfusiones debido a la anemia que presentan un gran número de enfermos de HHT (Kjeldsen y Kjeldsen, 2000; Zarrabeitia y col., 2010). Clásicamente se empleaba el ácido ϵ -aminocaproico debido a su actividad antifibrinolítica, (Annichino- Bizzacchi y col., 1999; Saba y col., 1994) pero actualmente ha sido sustituido por el ácido tranexámico, 10 veces más eficaz, y que además aumenta los niveles de expresión de Endoglina y ALK1 en células endoteliales (Fernandez-L y col., 2007b; Morales-Angulo y col., 2007). El ácido tranexámico actúa inhibiendo el paso de plasminógeno a plasmina, con lo que ésta no podrá degradar la fibrina del coágulo. De esta manera, se disminuye el sangrado, favoreciendo la cascada de coagulación en vez de la de fibrinólisis.

Con el fin de buscar tratamientos para el alivio sintomático de estos pacientes, en el laboratorio estudiamos fármacos que mediante un mecanismo molecular u otro estén involucrados directa o indirectamente en el proceso de angiogénesis y que sigan una de las siguientes tres estrategias de actuación en las células endoteliales: i) que promuevan la cascada de coagulación, disminuyendo la fibrinólisis y evitando el sangrado (Antifibrinolíticos); ii) que sean capaces de aumentar la expresión de ENG o ALK1 compensando la haploinsuficiencia existente en HHT, favoreciendo así una angiogénesis más adecuada; o iii) fármacos antiangiogénicos que en tratamiento local en la mucosa nasal puedan disminuir la angiogénesis anormal y defectuosa de los pacientes. Con estas estrategias se detendría la progresión de las telangiectasias en la mucosa nasal y gástrica y se evitarían los sangrados.

Debido a la necesidad de nuevos tratamientos en la HHT, existen fármacos en la actualidad que respaldados por publicaciones en HHT o en otras anomalías vasculares o cáncer, hacen que su estudio sea de interés potencial terapéutico para los pacientes. Algunos de estos fármacos se explican a continuación.

5.4.1 Estrógenos

Los estrógenos pertenecen a la familia de las hormonas esteroideas, caracterizadas por su estructura bioquímica de 18 átomos de carbono. Controlan un gran número de procesos celulares como son el crecimiento, la diferenciación y el sistema reproductivo. La principal fuente de estrógenos es el 17- β estradiol (E2), que se convierte en Estrona (E1) y Estriol (E3), siendo los niveles de este último mucho mayores en mujeres embarazadas. Los estrógenos pueden interaccionar con dos tipos de receptores ER- α y ER- β , que ejercen su función mediante distintas rutas de señalización regulando la expresión de distintos genes, interactuando con la maquinaria de transcripción a través de los elementos respuesta a estrógenos (ERE) (Cheskis y col., 2007; Noriega-Reyes y Langley, 2008; Zhao y col., 2010).

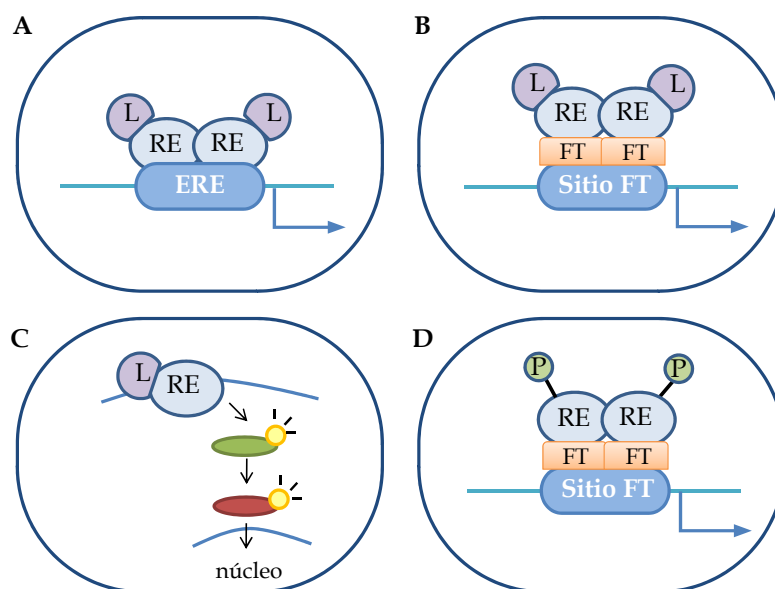


Figure 7. Diferentes rutas de actuación de los receptores de estrógenos. A) Los dímeros de RE activados tras la asociación del ligando se unen a las secuencias ERE en los promotores de los genes diana. B) Tras la unión del ligando el dímero de RE, interacciona con factores de transcripción (FT), promoviendo su actividad. C) El ligando estrogénico actúa en la membrana uniéndose al RE, interaccionando con la señalización celular de otras proteínas en el citoplasma. D) El dímero de RE se activa independientemente de ligando mediante fosforilación de distintas quinasas (Modificado de Zhao y col., 2010).

5.4.1.1 Raloxifeno.

El hidrocloreuro de Raloxifeno es un modulador selectivo de receptor de estrógenos (SERM; *selective estrogen receptor modulator*). Se usa en la prevención de osteoporosis en

mujeres postmenopáusicas bajo el nombre de *Evista*, ya que el déficit de estrógenos es un factor clave en esta patología. Muestra acciones estrogénicas sobre el hueso y antiestrogénicas en el útero y mama. Su uso en la prevención/tratamiento de osteoporosis en mujeres menopáusicas se aprobó en 1994 en EEUU y en la UE. Distintos ensayos clínicos y estudios han demostrado la eficacia de este fármaco en el tratamiento de fracturas en mujeres menopáusicas o mostrando una disminución de los niveles de colesterol LDL y del riesgo de padecer cáncer de mama y tumor endometrial maligno (Bjarnason y col., 2001; Delmas y col., 1997). Diversos estudios demuestran que el Raloxifeno es tan eficaz como otro SERM llamado Tamoxifeno reduciendo el riesgo de padecer cáncer de mama, y que ambos reducen igualmente las fracturas en hueso consecuencia de la osteoporosis. Sin embargo, pacientes tratadas con Raloxifeno presentaban menos efectos secundarios asociados que las pacientes tratadas con Tamoxifeno. Estas mujeres presentaron un 36% menos de cáncer uterino y un 29% menos de trombosis venosas profundas y embolias pulmonares (Estudio STAR; *Study of Tamoxifen and Raloxifen*, Runowick y col., 2010).

Basándose en los buenos resultados indirectos obtenidos en la reducción de las epistaxis de mujeres HHT con cáncer de mama tratadas con Tamoxifeno (Jameson y Cave, 2004; Zacharski y col., 2001; Webb y col., 1995), y las ventajas del Raloxifeno frente al Tamoxifeno en cuanto a efectos secundarios, el equipo clínico de la unidad de HHT en España (Hospital de Sierrallana, Torrelavega, Cantabria) consideró la posibilidad de estudiar el efecto del Raloxifeno, en 19 pacientes postmenopáusicas diagnosticadas con HHT (criterios de Curaçao) y osteoporosis (densitometría ósea) con edades comprendidas entre 47-74 años. Once de estas mujeres eran HHT2, 6 eran HHT1 y 2 de ellas tenían criterios de Curaçao aunque no se sabía la mutación causante de la HHT. Todas las pacientes tenían telangiectasias, epistaxis y herencia familiar. La mayoría de estas 19 mujeres (73%) mostraron una mejoría en los sangrados nasales tras 6 meses de tratamiento. Según la escala de Sadick (Sadick y col., 2003) que mide la frecuencia de los sangrados (grado 1: menos de 1 vez/semana; grado 2: más de 1 vez/semana; grado 3: más de 1 vez/día) y la cantidad (grado 1: pañuelo de papel algo manchado; grado 2: pañuelo de papel empapado; grado 3: necesidad de recipiente para recoger la sangre), la disminución de las epistaxis fue de un grado en ambas escalas. En la figura 10 podemos observar que la media de la frecuencia de los sangrados en estas pacientes era de 2,36 antes del tratamiento y de 1,31 tras el mismo. En cuanto a la cantidad, observamos una bajada desde 2,26 a 1,42 (Figura 10A,B). También se

midieron los niveles de Hemoglobina produciéndose un aumento en un 9,25%, desde $11,18 \pm 0,10$ g/dl a $12,08 \pm 0,15$ g/dl tras el tratamiento con Raloxifeno (Figura 10C).

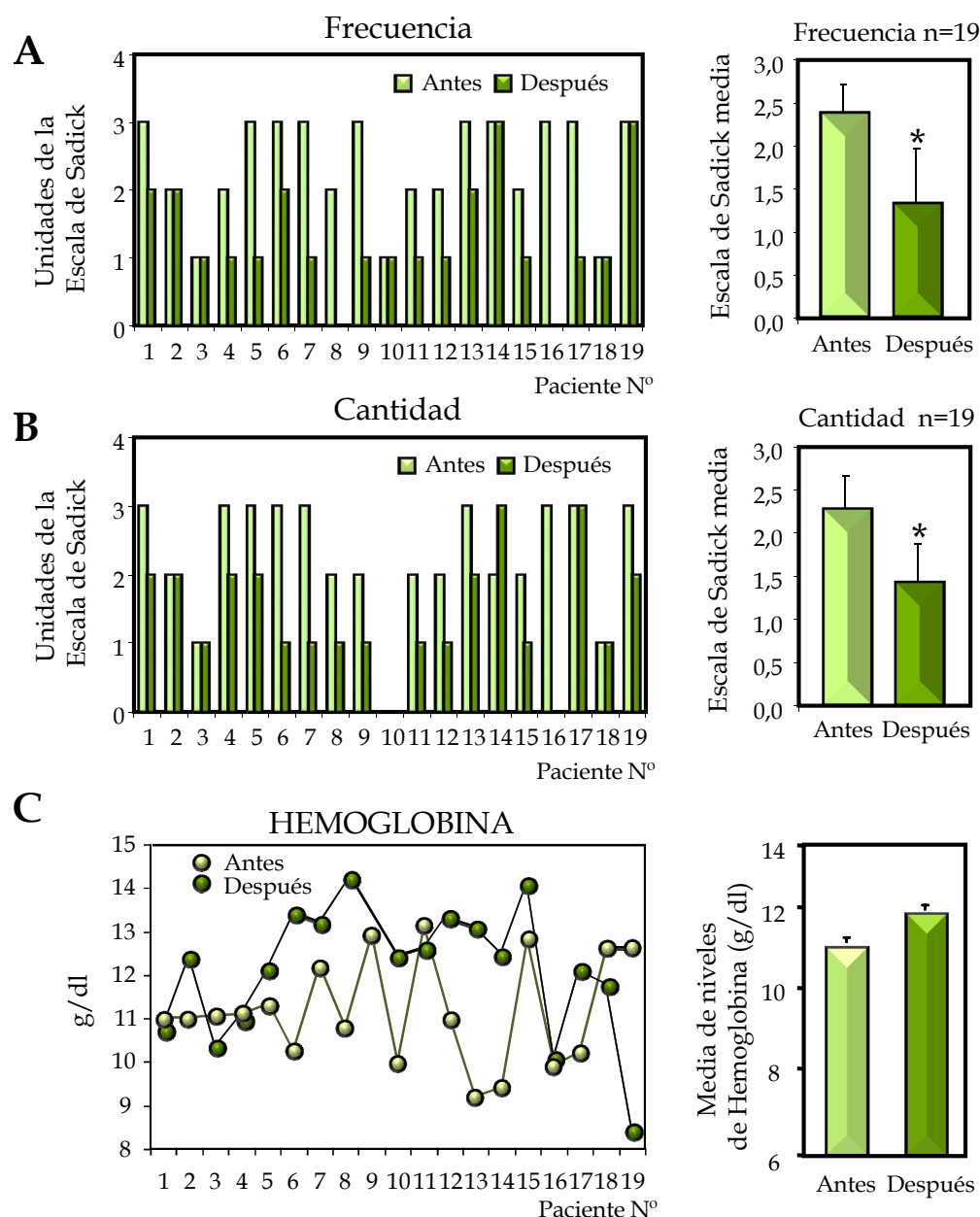


Figura 10. Raloxifeno como terapia para las epistaxis en pacientes HHT. A,B) La frecuencia y la cantidad de los sangrados nasales en mujeres postmenopáusicas HHT fueron medidas antes y tras 6 meses de tratamiento. Se observa una disminución en los niveles de sangrado en la mayoría de las diecinueve pacientes integrantes del estudio y en las medias tanto de la frecuencia como de la cantidad de los sangrados. C) Los niveles de Hemoglobina medidos antes y después del tratamiento con Raloxifeno, muestran que existe una tendencia a aumentar los niveles de ésta en sangre al disminuir las epistaxis.

5.4.1.2 Estriol

La hormona estrogénica Estriol (E3) deriva del metabolismo del 17- β Estradiol, pero a diferencia de ésta, tiene una actividad biológica mucho menor. Su mayor concentración en el organismo se da durante el embarazo, ya que el Estriol es excretado por la orina en cantidades 1000 veces mayores que en estado de no embarazo (Zhao y col., 2010).

El Estriol ha sido utilizado en uso tópico para ensayos clínicos, mostrando la capacidad de engrosar el epitelio (Creidi y col, 1994) o de estimular la síntesis de colágeno en la piel de mujeres postmenopáusicas (Varila y col., 1995). El-Ghazzawi y col, en 1979 estudiaron la administración sistemática de Estradiol en mujeres que tomaran la píldora anticonceptiva comparando con el modelo animal de cobayas, observando en ambos casos una hiperplasia de las glándulas de la mucosa, infiltración de células mononucleares en el tejido conectivo y cambios en la proliferación endotelial, desapareciendo los cilios de la mucosa nasal y apareciendo la estratificación del tejido (El-Ghazzawi y col., 1979). Tras el estudio de los distintos ensayos existentes, Sadick y colaboradores, estudiaron este estrógeno en aplicación tópica a la mucosa nasal de pacientes HHT en lugar del estradiol ya que su metabolización es más rápida y tiene menos afinidad por los receptores de estrógenos. Tras 6 meses en los que los 12 pacientes integrantes del ensayo se aplicaron pomada con Estriol al 0.1% 2 veces al día, se observó una disminución en los niveles de cilios de la mucosa y un engrosamiento de la misma. El epitelio columnar ciliado anterior al tratamiento, se convertía en un epitelio estratificado queratinizado (Sadick y col., 2005; Sadick y col., 2003). El tratamiento tópico con Estriol mostró los mismos resultados que tratamientos con estradiol y estos cambios eran reversibles al abandonar el tratamiento con Estriol.

5.4.2 Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son una serie de compuestos de origen vegetal, de naturaleza no esteroidea, con similitudes estructurales a los estrógenos naturales (17 β -Estradiol). Se clasifican en 4 grupos principales: isoflavonoides, cumestanos, estilbenos y lignanos, siendo la más conocida y estudiada la categoría de las isoflavonas, que se encuentra en numerosas especies vegetales sobre todo en la familia de las leguminosas, destacando la soja y el trébol rojo por su alto contenido (Arbues y col., 2005). Su actividad estrogénica se descubrió al investigar “la enfermedad del trébol”, que apareció en

ovejas australianas alimentadas con esta planta, las cuáles sufrían trastornos en el aparato genital y esterilidad (Bennetts y col., 1946).

La afinidad de las isoflavonas para unirse a los receptores estrogénicos, es menor que la del 17 β -Estradiol, presentando una afinidad de unión a RE- β 30 veces mayor que a RE- α , con mayor actividad transcripcional, hecho del que derivan muchas de sus acciones tisulares (Kuiper y col., 1998). Sus acciones se desarrollarían en órganos y tejidos en los que RE- β se encuentre en cantidades relevantes como el hueso, sistema nervioso central y no actuarían en órganos como la mama y endometrio donde hay expresión preferencial de RE α . (Navarro Moll, 2005).

Además de los efectos derivados de su unión a los receptores estrogénicos, las isoflavonas como la Genisteína o los cumestanos como el Resveratrol, son capaces de inhibir diversos enzimas implicados en numerosos procesos fisiológicos.

5.4.2.2 Genisteína

Esta isoflavona está atrayendo últimamente el interés científico ya que parece aportar beneficios en la prevención de tumores, en desórdenes cardiovasculares y en la menopausia. Fotsis y colaboradores han demostrado en distintas publicaciones como la población oriental debido a su alto consumo de soja en la dieta, poseen 30 veces más Genisteína en la orina que la población occidental, por lo que se ha relacionado este factor con la menor incidencia de cáncer de mama, útero o endometrio en esas regiones (Fotsis y col., 1995; Fotsis y col., 1997). El fitoestrógeno Genisteína posee propiedades antiangiogénicas, con ausencia de toxicidad. Su potente inhibición de la angiogénesis, lo hace candidato para usarlo en terapia, inhibiendo el crecimiento de los tumores y otras enfermedades angiogénicas (Emmerson y col., 2010; Fotsis y col., 1995).

5.4.2.3 Resveratrol

Este cumestano, se encuentra en uvas y otras frutas y posee múltiples dianas intracelulares. Regula la progresión del ciclo celular, induce el proceso de apoptosis, inhibe la angiogénesis y modula distintos factores de transcripción entre otras funciones (Athar y col, 2009; Kraft y col., 2009, Wang y col., 2011). En los últimos años, se le ha conocido por sus propiedades antioxidantes y se ha convertido en un buen candidato para la terapia antiangiogénica en cáncer. Muchos son los artículos que

muestran cómo actúa en distintos tipos de tumores inhibiendo la progresión tumoral y la angiogénesis (Athar y col., 2007).

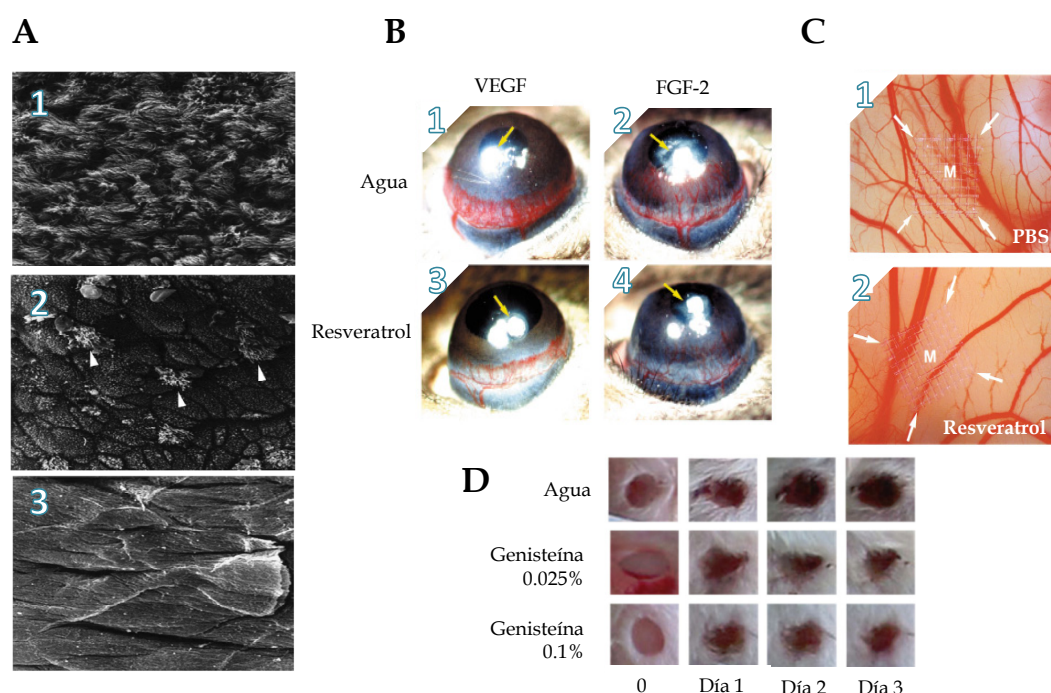


Figura 8. Estrógenos y fitoestrógenos. A) Efecto de Estriol en mucosa nasal pacientes HHT. 1) Mucosa nasal de pacientes HHT al microscopio electrónico dónde se observa que la superficie está densamente cubierta por cilios. 2) Mucosa nasal de pacientes tratados con pomada con Estriol durante 6 meses. La superficie de la mucosa muestra casi en su totalidad células sin cilios. 3) Tras 12 meses de tratamiento con Estriol la mucosa de los pacientes muestra un remplazo total de un epitelio ciliado por uno escamoso (Adaptado de Sadick y col., 2005). **B y C) Efecto inhibitorio del Resveratrol sobre la angiogénesis.** B) Inserción de discos con VEGF y FGF-2 en la córnea promueve angiogénesis, que se ve inhibida con Resveratrol. C) Inhibición de angiogénesis en membrana corioalantoidea de pollo al colocar disco con Resveratrol. La vasculatura del disco tratado con PBS1X está intacta. (Adaptado de Brakenhielm et al, 2001). **D)** Efecto de la Genisteína sobre la reparación de heridas. Tras 3 días de tratamiento al 0.1% el cierre es mayor que en la herida sin tratar (Adaptado de Park y col., 2011).

5.4.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que secuestran las especies reactivas del oxígeno (ROS) acumuladas en las células debido al estrés oxidativo causado por el desequilibrio entre la producción de estas ROS y la capacidad de la célula de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un

constante aporte de energía metabólica. Desequilibrios en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula.

Se ha comprobado que la actividad de muchos factores de transcripción está regulada por cambios de tipo redox (Kunsch y Medford, 1999). Generalmente, se ha demostrado que residuos de cisteína conservados en las regiones de unión del ADN de estas proteínas son los blancos de la regulación redox. Los dos factores de transcripción mejor caracterizados sujetos a regulación redox en la vasculatura son NF- κ B y AP1.

5.4.3.2 N-acetilcisteína

Se cree que los grupos sulfhidrilo libres de este mucolítico reaccionan sobre los puentes disulfuro existentes en las secreciones bronquiales. Esto ocasiona la desagregación de las fibrillas de mucoproteínas, lo que se traduce finalmente en una disminución de la viscosidad del mucus. También ejerce una actividad citoprotectora en el aparato respiratorio, actuando frente a la acción del estrés oxidativo por radicales libres oxidantes de diverso.

Gussem y colaboradores, publicaron un ensayo de 43 pacientes de HHT que fueron tratados con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) durante 12 semanas. El objetivo de este estudio fue investigar si pacientes HHT experimentaban una reducción de las epistaxis cuando eran tratados con el secuestrador de radicales de O_2 , NAC. Tras el tratamiento pudieron observar que las epistaxis de estos pacientes disminuyeron moderadamente, tanto en frecuencia como en cantidad. Un dato a destacar es que esta mejoría era mayor en los pacientes de sexo masculino y con mutación en Endogлина (HHT1). Pacientes HHT2 apenas notaron mejoría (de Gussem y col., 2009).

5.4.4 Betabloqueantes.

Los fármacos β -bloqueantes son antagonistas de los receptores β -adrenérgicos y bloquean estos receptores en diferentes órganos como el corazón, los vasos periféricos, los bronquios, el páncreas y el hígado. Se distinguen β -bloqueantes cardiosselectivos o no, hidrosolubles y liposolubles. Sus principales indicaciones son la hipertensión arterial, la angina de pecho, el infarto agudo de miocardio, determinadas arritmias, la

insuficiencia cardiaca y la tirotoxicosis. También se emplean para aliviar la ansiedad, el glaucoma y en la profilaxis de la migraña.

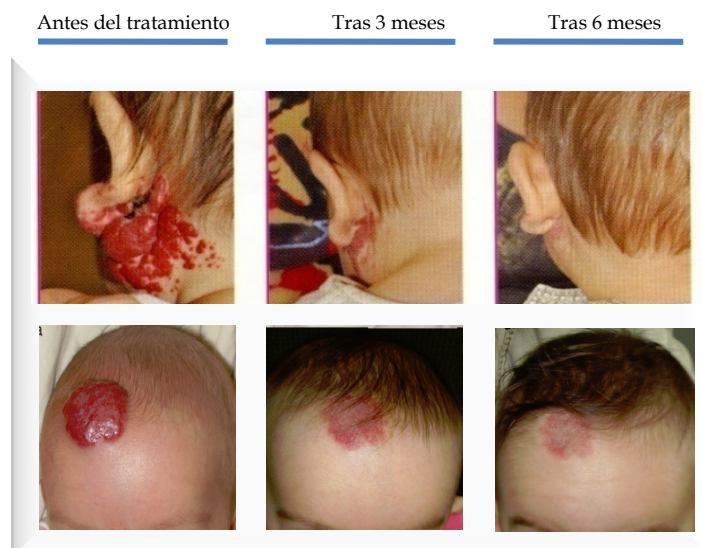
5.4.4.2 Propranolol

El Propranolol es un β -bloqueante no cardiosselectivo. En los últimos años además de para sus aplicaciones habituales (arritmias, hipertensión o migrañas) se está utilizando en Hemangiomas Infantiles (HI) por sus recientemente descubiertas propiedades antiangiogénicas (Leaute-Labreze y col., 2008). Estos hemangiomas son tumores vasculares benignos de la infancia, formados por células endoteliales que proliferan en respuesta al factor VEGF y FGF. La desaparición del hemangioma se manifiesta desde el principio del tratamiento, observándose una clara evolución a las primeras dos semanas (Sanchez Carpintero y col., 2011; Sanchez-Perez y col., 2009). Se caracterizan por la presencia de 3 fases a lo largo de su evolución: proliferativa, de involución, e involutiva, existiendo distinta expresión de genes en cada fase. En cuanto al mecanismo de acción por el que actúa el Propranolol, se han señalado 3 posibles vías de actuación (Storch y Hoeger, 2010): a) por su efecto vasoconstrictor, visible clínicamente al observarse un cambio de la coloración; b) mediante la regulación de las vías implicadas en la expresión de genes angiogénicos, disminuyendo la expresión de factores proangiogénicos involucrados en el crecimiento de los HI como el VEGF y el bFGF; c) por último, ocasionando apoptosis de las células endoteliales (Sommers-Smith y Smith, 2002).

Son muchas las publicaciones que últimamente utilizan el Propranolol como terapia antiangiogénica no sólo en hemangiomas sino en otros tumores inhibiendo la expresión de genes como VEGF, MMP2, MMP9, parando el ciclo celular o inhibiendo la actividad de los receptores de VEGF (Annabi y col., 2009; Lamy y col., 2010).

(Página siguiente)

Figura 9. Bebés con un HI en cuello y cuero cabelludo tratados con Propranolol. A los 3 meses de tratamiento con 2 mg/kg/día de Propranolol se puede apreciar una clara mejoría con aplanamiento de la lesión, observando una eliminación del HI casi completa a los 6 meses (Adaptado de Sánchez-Carpintero y col., 2011).



5.4.5 Inmunosupresores

Los inmunosupresores son drogas que actúan activando o inactivando distintos factores implicados en procesos celulares que desencadenan la inhibición de uno o varios pasos de la respuesta inmune. Los inmunosupresores se han clasificado en tres grupos: i) drogas inmunosupresoras, ii) anticuerpos policlonales y monoclonales y iii) nuevos métodos de inmunosupresión. Cada grupo se subdivide según el lugar de acción de los inmunosupresores.

5.4.5.2 Tacrolimus (FK506)

Este inmunosupresor es usado principalmente en trasplantes alogénicos, para reducir la actividad del sistema inmune y así disminuir el riesgo de rechazo. También es usado en preparación tópica en el tratamiento de dermatitis atópica, ya que suprime la inflamación en forma similar a los esteroides. Se descubrió en 1984 en el caldo de fermentación de una muestra de suelo japonés que contenía la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*. Fue inicialmente aprobado por la agencia americana del medicamento (FDA; *Food and Drug Administration*) en 1994 para uso en trasplantes hepáticos, extendiéndose su uso a otros órganos. Su actividad es similar a la Ciclosporina, sin embargo, parece que la incidencia de rechazo agudo es menor en el uso de Tacrolimus (Jordan y col., 1997).

Su receptor intracelular principal es la inmunofilina FKBP12 (*FK binding protein*). Estructuralmente, Tacrolimus posee dos dominios, uno de unión a su receptor FKBP12 y otro efector que interactúa con la fosfatasa Calcineurina. En presencia del inmunosupresor FK506 en la célula T, éste se une a la inmunofilina FKBP12. Este complejo FK506-FKBP12, inhibirá a la enzima Calcineurina, encargada de defosforilar al factor de transcripción NFAT (factor nuclear del linfocito T activado). El factor NFAT fosforilado no se trasloca al núcleo y no activa la expresión de interleuquinas, como la IL-2, implicadas en la activación de los linfocitos T y por tanto de la respuesta inmune (Sasakawa y col., 2005).

FKBP12 también actúa como inhibidor del T β RI, en la vía señalización de TGF- β . Giordano y colaboradores observaron como el FK506 activaba la ruta de señalización de TGF- β aumentando la fosforilación de Smad2/3, mediante el secuestro de FKBP12 en células de la musculatura lisa vascular de ratón (VSMCs; *Vascular Smooth muscle cells*) (Giordano y col., 2008).

En 2006, Skaro y col, observaron que tras tratar una paciente de HHT con terapia inmunosupresora combinada de Sirolimus-Tacrolimus tras trasplante hepático, los síntomas de la enfermedad prácticamente desaparecieron (Skaro y col., 2006). La paciente sufría de un elevado gasto cardíaco debido a malformaciones arteriovenosas en hígado. En los 6 años anteriores al trasplante esta paciente de 53 años había necesitado múltiples transfusiones sanguíneas debido a hemorragias gastrointestinales y a epistaxis, por lo que sufría de una constante anemia (80 g/L Hb). Tenía telangiectasias visibles en dedos, pecho, labios, lengua, faringe, esófago, estómago, y duodeno. Tras el trasplante hepático para la corrección funcional de este órgano y del fallo cardíaco recibió tratamiento inmunosupresor de Sirolimus y FK506 para evitar el rechazo, combinado con el antiagregante plaquetario aspirina y el corticoide prednisona. La paciente recobró su salud, desde el primer mes de tratamiento, ya que desaparecieron las telangiectasias, las epistaxis, y la consecuente anemia (110 g/L Hb). Los autores justifican estos efectos a la inhibición del VEGF por parte del Sirolimus y de la aspirina (suprime la expresión de la ciclooxigenasa-2, activador de VEGF). La expresión del factor angiogénico VEGF se encuentra aumentada en pacientes HHT, se cree que como compensación a la haploinsuficiencia en los genes proangiogénicos; Endoglin o ALK1 (Cirulli y col., 2009; Giordano y col., 2003), pero el inmunosupresor FK506 también podía estar ayudando a esta normalización angiogénica.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Puesto que hoy por hoy no existe una cura definitiva para las hemorragias en la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria, el objetivo general de esta Tesis ha sido la búsqueda de terapias farmacológicas y su mecanismo de acción en HHT, que puedan disminuir los sangrados y mejorar de esta forma la calidad de vida de los pacientes.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Estudio de células endoteliales tratadas con fármacos que puedan compensar la haploinsuficiencia de los genes *ENG* y *ALK1*.

Objetivo 2: Estudio de células endoteliales tratadas con fármacos antiangiogénicos como posibles candidatos para normalizar el exceso de la vasculatura anormal presente en la mucosa de estos pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

Para el estudio de las líneas celulares inmortalizadas endoteliales HMEC-1 (*Human Microvascular Endothelial Cell line-1*) (Ades y col., 1992) y EOMA (*Mouse Hemangioendothelioma Endothelial Cells*) (Hoak y col., 1971) es necesario hacer un tapizado (*coating*) de las placas a utilizar con gelatina bovina al 0.2 % (Sigma) en PBS para que sirva de sustrato y que ejerza las funciones de matriz extracelular. El tratamiento es de 1 hora a 37°C. Las células HMEC-1 se cultivan en MCDB131 (Gibco) suplementado con 1ng/ml de EGF (*Epidermal growth factor*) y 1µg/ml de hidrocortisona. Las células EOMA se cultivan en DMEM (Gibco). Los cultivos primarios de HUVEC, células endoteliales derivadas de vena umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, Lonza) se cultivaron en placas tratadas con gelatina bovina con medio EBM2 (*Endothelial Basic Medium 2*, Lonza) suplementado con EGM2 (*Endotelial Growth Medium*, Lonza). Los experimentos realizados con cultivos primarios de HUVECs se hicieron siempre en pases inferiores a 8. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM de L-Glutamina y 100 u/ml de Penicilina/streptomycin (Gibco). Para hacer pases de las células, éstas se levantaron usando una solución de Tripsina-EDTA (0,05% y 0,02%, respectivamente).

1.1 Tratamiento con la citoquina TGF-β1

La proteína recombinante humana TGF-β1 se adquirió de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se usó a las concentraciones y tiempos indicados en cada experimento, en presencia de una concentración de 0,2% de SFB, para evitar el enmascaramiento de los resultados por la presencia de factores de crecimiento circulantes en el suero. Se empleó 1ng/ml durante 3 horas para estimular la vía ALK1/Endoglin y 10ng/ml durante 24 horas para estimular la vía de ALK5.

1.2 Tratamientos con fármacos

- Raloxifeno (Sigma-Aldrich): 0,05nM, 0,1nM, 0,2nM, 0,5nM, 1nM, 2,5nM, 5nM y 10nM
- Tacrolimus (FK506, Sigma-Aldrich): 100ng/ml.
- Propranolol (Sigma-Aldrich): 20μM, 50μM, 100μM.
- N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich): 10μM, 20μM, 50μM, 75μM, 100μM.
- Genisteína (Sigma-Aldrich): 1,5μM, 5μM, 10μM, 50μM y 100μM.
- Resveratrol (Sigma-Aldrich): 1μM, 10μM, 50μM, 100μM.
- Estriol (Sigma-Aldrich): 0,05nM, 0,1nM, 0,2nM, 0,5nM, 1nM, 1μM, 10μM, 50μM y 100μM.

2. Transfecciones y Ensayos de luciferasa

Todos los ensayos de luciferasa se llevaron a cabo mediante la transfección transitoria de las células HMEC-1 en placas de 24 pocillos, utilizando Superfect (Qiagen) como reactivo de transfección. Los plásmidos se incubaron en medio Opti-MEM (Gibco) sin SFB ni antibióticos junto con el Superfect, durante 15 minutos y, posteriormente, la suspensión de los complejos Superfect-ADN se añadió sobre las células, en 0.5 ml de medio de cultivo completo dejándolas en el incubador a 37°C. A las tres horas de la transfección, los cultivos se lavaron con PBS y se cambió el medio por medio fresco completo (10% SFB). Las células se recogieron y lisaron en tampón de lisis 1X de Promega tras 24 horas y se midió su actividad luciferasa. Los reporteros empleados se encuentran acoplados al ADNc que codifica la enzima luciferasa. Las unidades relativas de luciferasa se determinaron en un luminómetro TD20/20 (Promega). En todos los casos la transfección incluyó un vector de expresión de β-galactosidasa insensible a TGF-β (pSV40/-βgal) que se utilizó como control interno para corregir la eficiencia de transfección. La medida de la actividad β-galactosidasa se llevó a cabo mediante el reactivo *Galacto-Light* (Tropix). Se definen como unidades relativas de luciferasa (URL) el cociente de la actividad luciferasa entre la de β-galactosidasa. Todos los puntos de las transfecciones se hicieron por triplicado y éstas se repitieron al menos en tres experimentos independientes.

Reportero	Vector	Descripción	Procedencia
pCD105	pXP2	Zona proximal del promotor de Endoglina (-450/+350)	Generado en laboratorio (Sanchez-Elsner y col., 2002)
pALK1	pGL2	Zona proximal del promotor de ALK1 (-1035/+209)	(Garrido-Martín y col., 2011)
pALK5	pGL2	Zona proximal del promotor de ALK5 (-867/+228)	Dr. Soichi Kojima
BRE-luc	pGL3	Contiene 2 sitios en tándem del promotor de <i>ID1</i> [(-1052/-1032)/(-1105/-1080)]	(Korchynskyi y ten Dijke, 2002)
CAGAluc	pGL3	Reportero de la vía ALK5	Dr Peter ten Dijke
pId1luc	pGL3	Fragmento -1585/+88 del promotor de <i>ID1</i>	(Tournay y Benezra, 1996)
P800luc	pUC19	Fragmento -800/+71 del promotor de <i>PAI-1</i>	(Van Zonneveld y col., 1988)
pUPAluc	pGL3	Fragmento de promotor de uPA	Dr. JF Santibañez
pKBF	pGL2	Contiene 3 elementos de respuesta a NFkB en tándem	(Yano y col., 1987)

Tabla 1. Plásmidos utilizados para los ensayos de transfección en células HMEC-1.

3. Análisis de expresión de ARN

3.1 PCR cuantitativa a tiempo real

Para el análisis cuantitativo de la cantidad de transcritos de los distintos genes se extrajo ARN empleando el sistema comercial *RNAeasy* (Qiagen). La síntesis de ADNc se llevó a cabo a partir de 1µg de ARN total mediante el *kit* comercial *First Strand cDNA Synthesis* (Roche), usando como cebadores oligonucleótidos hexaméricos de secuencias obtenidas al azar (*random primers*) en un volumen final de reacción de 20µl, siguiendo las indicaciones del fabricante y el ADNc resultante fue utilizado como molde de la reacción de PCR en tiempo real. Para ello, se utilizó la mezcla de reacción iQ SyBR *Green Supermix* (BioRad), que contiene la polimerasa, el Mg₂Cl, la mezcla de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), el tampón de reacción y SYBR-green I (BioRad) que es un fluoróforo que se intercala en ADN bicatenario uniéndose al surco menor del

ADN y aumentando 1.000 veces su fluorescencia, relacionándose la intensidad de la señal con la cantidad de producto existente. Los cebadores utilizados para las reacciones de PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 2. Se amplificó el ARN ribosómico de 18S humano, como control interno debido a su abundante expresión y que no varía a consecuencia de los mecanismos normales de regulación transcripcional. Se realizaron triplicados de cada muestra y de cada experimento, mostrándose la media de los experimentos.

Gen	Secuencia oligonucleótidos 5'-3'
ALK1	Directo: ATCTGAGCAGGGCGACAC Reverso: ACTCCCTGTGGTGCAGTCA
Endoglin	Directo: AGCCTCAGCCCCACAAGT Reverso: GTCACCTCGTCCCTCTCG
ALK5	Directo: CATTAGATCGCCCTTTTATTTC Reverso: CACAATAGTTCTCGCAATTGTT
UPA	Directo: GGCAGGCAGATGGTCTGTAT Reverso: GGACTACACCGCTGACACG
PAI-1	Directo: CACCCTCAGCATGTTTCATTG Reverso: GGTCATGTTGCCTTTCCAGT
18S	Directo: CTCAACACGGGAAACCTCAC Reverso: CGCTCCACCAACTAAGAACG

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para la PCR cuantitativa (qRT-PCR).

4. Análisis de expresión de proteínas

4.1 Citometría de flujo

Las células se despegaron de las placas de cultivo con tripsina-EDTA, se centrifugaron 5 minutos a 1.200 rpm y se resuspendieron en el volumen adecuado de PBS. Se bloquearon con suero AB+ humano (2% en PBS) durante media hora a 4°C. Tras el bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora a 4°C y como anticuerpos secundarios se utilizaron diferentes IgG policlonales acoplados

al fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen) y las incubaciones fueron de 30 minutos a 4°C. Las células se analizaron en un citómetro EPICS XL (Coulter, Hialeah, FL), con un láser de argón sintonizado a una longitud de onda de emisión de 488nm. Los valores se dan en forma de índice de expresión, resultado del producto del porcentaje de células positivas por la intensidad de fluorescencia media de la población total de células. Se analizaron un mínimo de 5.000 células, en cada caso.

Proteína que reconoce el anticuerpo	Especie dónde se generó	Especie que reconoce	Aplicación	Referencia
β -actina	Ratón	Humano	WB	Sigma-Aldrich, A1978
Endoglina	Ratón	Humano	CF	(Pichuantes y col., 1997)
ALK1	Ratón	Humano	CF	R&D Systems, MAB170
HLA I	Ratón	Humano	CF	Hibridoma producido en el laboratorio
pSmad1/5	Conejo	Humano	WB	Cell signalling, # 9516
Smad4	Ratón	Humano	EMSA, WB, IF	Santa Cruz Biotech, sc-7966
Sp1	Conejo	Humano	EMSA,ChIP	Santa Cruz Biotech, sc-59
FKBP12	Conejo	Humano	IF	Santa Cruz Biotech, sc-28814
Procaspa-3	Humano	Ratón	WB	RB-1197-P1, Thermo Scientific
Caspasa-3	Humano	Ratón	WB	Cell signalling, # 9662

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en esta Tesis. El significado de las abreviaturas es el siguiente: CF, Citometría de flujo; ChIP, inmunoprecipitación de cromatina; EMSA, ensayo de movilidad electroforética retardada; IF, inmunofluorescencia; WB, western blot.

4.2 Western blot

Los lisados celulares se consiguieron mediante la incubación durante 30 minutos a 4°C en agitación orbital con tampón de lisis celular. Para el estudio de proteínas nucleares, se utilizó un tampón de lisis comercial (*Nuclear Extract Kit*, Active Motif) y para la detección de proteínas fosforiladas, se empleó una composición especial, añadiendo β -glicerolfosfato 40 mM e inhibidores de fosfatasas (imidazol 200 mM, NaF 100 mM, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 115 mM, Na_3VO_4 100 mM y tartrato sódico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 400 mM). Se

raspó la superficie de las placas de cultivo para recoger los restos celulares y se centrifugaron los extractos durante 5 minutos a 13.400 r.p.m. a 4°C para eliminar los restos de membranas celulares.

Se determinó la concentración de proteína de los lisados por la reacción de Bradford (BioRad), respecto a una recta patrón de calibrado de albúmina sérica bovina (BSA, Roche Diagnostics). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), de distinto porcentaje de acrilamida según el tamaño de la proteína a analizar (10% o 12%). Se utilizó con tampón de carga Laemmli 6X para completar los lisados, en una concentración final de 1X y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos antes de su carga en el gel. El sistema electroforético empleado fue el MiniProtean III (BioRad). Las proteínas se separaron en función del peso molecular y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham).

Las uniones inespecíficas se bloquearon incubando la membrana en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-Tween20 0,05% (Tris-HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05%) a T^a ambiente. Una vez bloqueada, la membrana se incubó con los anticuerpos correspondientes a 4°C toda la noche. Tras realizar 4 lavados de 10 minutos con PBS-Tween20, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa (DakoCytomation), durante 60 minutos a T^a ambiente. Tras otra serie de lavados, se llevó a cabo la reacción de quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial *SuperSignal* (Pierce). La densitometría de las bandas reveladas en películas Curix RP2 Plus (AGFA) se realizó con el programa informático Adobe Photoshop CS (*Adobe Systems Incorporated*). Como control de carga se empleó actina revelada con anticuerpo anti-actina.

4.3 Microscopía de inmunofluorescencia

El cultivo de estas células se realizó sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placas de 24 pocillos y tapizados anteriormente con gelatina bovina (Sigma Aldrich) al 0,2% en PBS. Tras el tratamiento, las muestras se fijaron con formaldehído al 3,5% en PBS durante 20 minutos a 4°C. Para el marcaje de proteínas citosólicas o nucleares, a la mezcla de fijación se añadió como agente permeabilizante L- α -lisofosfatidilcolina (Sigma Aldrich) a una concentración 100 μ g/mL. Las muestras se bloquearon una hora a 4°C con BSA al 1% en PBS y se incubaron con anticuerpo

primario durante 1 hora a 4°C en oscuridad. Tras tres series de lavados se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios, que llevaban acoplado el fluorocromo Alexa 488 (emisión en verde) o el Alexa 647 (emisión en rojo lejano) (Molecular Probes, Invitrogen). Por último, el montaje se realizó colocando los cubreobjetos por el lado que contenían las células sobre portaobjetos con una gota de medio de montaje Prolong (*Prolong Gold with Dapi*, Invitrogen) que contiene DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para tinción de los núcleos. Este agente intercalante tiñe el ADN y emite fluorescencia azul al ser irradiado con luz ultravioleta. El análisis se llevó a cabo en un microscopio láser de fluorescencia, con óptica confocal espectral Leica TCS SP2 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania).

Para marcar los filamentos de actina, las células fueron fijadas, marcadas y permeabilizadas en un solo paso empleando 5 unidades/ml de Alexa-546 faloidina (Molecular Probes), 100µg/ml de L-α-lisofosfatidilcolina en PBS frío con 3,5% de formaldehído. Para la tinción de núcleos de células EOMA y HMEC-1 despegadas de la placa de cultivo, tras tratamiento con Propranolol, se procedió a la centrifugación de las células recogidas en el sobrenadante (1.500 rpm 5 minutos) y se resuspendieron en 75µl de etanol frío al 70%. Después se tomaron 25 µl de estos 75 µl y se le añadió 5 µl de DAPI. La muestra se colocó sobre un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos y se observó al microscopio de fluorescencia. El marcaje de Fosfatidilserina para el estudio de la apoptosis, se llevó a cabo mediante la incubación de las células con Anexina V marcada con FITC (*Annexin V-FITC Fluorescence Microscopy Kit*, BD Pharmingen™) en su propio diluyente durante 15 minutos a temperatura ambiente y tras 3 lavados con PBS, se procedió al montaje de las muestras. La tinción de fosfatidilserina, al igual que la tinción de núcleos, se observaron en un microscopio *Axioplan Universal* (Carl Zeiss, Jena, Germany) y se obtuvieron las fotos con una cámara Leica (DFC 350 FX CCD).

5. Ensayo de proliferación celular MTT

Tras los diferentes tratamientos, las células fueron incubadas con MTT (Sigma). El MTT, es una sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) que es reducida por las deshidrogenasas mitocondriales, dando como resultado formazán, de coloración violáceo. Se incubaron las células a una concentración final de 0,5 mg/ml de MTT en medio de cultivo, durante 3 horas a 37°C, en oscuridad. Tras retirar el medio se añadió DMSO, para disolver el formazán formado y se midió la

absorbancia a 560nm en un espectrofotómetro (*Novaspec Plus Visible Spectrophotometer*, Amersham Biosciences). Los valores de absorbancia obtenidos a partir de este método son directamente proporcionales a la cantidad de células viables. Los experimentos se repitieron al menos dos veces, empleando triplicados, los resultados que se muestran son representativos.

6. Ensayo de actividad gelatinasa o Zimografía

La zimografía de gelatina se utilizó para estudiar la actividad de las metaloproteinasas (MMP). Se usó una alícuota de 30 µl del sobrenadante de medio celular en el que habían crecido las células HMEC-1 con o sin tratamiento de Propranolol, y en ausencia de suero para evitar que las gelatinasas presentes en él degradasen la gelatina del gel y enmascarasen los resultados. A la alícuota de cada sobrenadante se le añadió tampón de carga Laemmli y la muestra se cargó en un gel de acrilamida al 10% conteniendo 1mg/ml de gelatina. El sistema electroforético empleado fue el MiniProtean III (BioRad) y tras 1h de electroforesis a 120V (separación electroforética), el gel se incubó en Tritón X100 al 2.5% durante 10 minutos, seguido por un lavado con agua destilada. Este proceso se realizó 3 veces, antes de la incubación toda la noche a 37°C en la solución que va a dar lugar a la reacción enzimática. La solución contiene 200mM NaCl, 10mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl a pH 7.5. Al día siguiente, el gel se tiñó con Azul de Coomassie 0.5% y se destiñó en 10% ácido acético, 40% metanol y agua. La actividad gelatinasa de las MMP se detecta como bandas desteñidas con coloración más clara que el resto del gel que aparece azul.

7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Se cultivaron células HUVEC en placas de cultivo de 15 cm de diámetro en presencia de Raloxifeno o FK506 hasta confluencia. Transcurrido el tratamiento las placas se fijaron con formaldehído al 1% en medio de cultivo DMEM (Gibco). Para la inmunoprecipitación de cromatina, se utilizó la batería comercial de reactivos *ChIP-IT Express* (Active Motif). La reacción de fijación se paró con la solución comercial de glicina, y las células se rasparon en presencia del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), lisándose después con el tampón de lisis comercial. Los núcleos se separaron usando un homogeneizador de cristal y posteriormente se

digirieron con un combinado enzimático durante 5, 10 y 15 minutos. Se determinó que el tiempo óptimo de digestión enzimática para obtener fragmentos de ADN genómico de aproximadamente 200 pares de bases, fue 15 minutos. Una alícuota de esta cromatina digerida se guardó para usarse como *input* (lisado nuclear total o cromatina no inmunoprecipitada). El resto, fue incubada con bolitas magnéticas acopladas a proteína G y a un anticuerpo policlonal de conejo anti-Sp1 o anti-Smad4 humano en el tampón adecuado, conteniendo inhibidores de proteasas aportadas por el fabricante. Como control positivo, se realizó en paralelo la inmunoprecipitación con polimerasa II y, como control negativo, con un combinado de IgG de conejo anti-humano. Se permitió la formación de inmunocomplejos en un agitador orbital a 4°C durante toda la noche. Tras ese periodo, las bolitas magnéticas se centrifugaron y se recogieron para su lavado y elución con el tampón proporcionado por el fabricante. Después, el entrecruzamiento creado por el formaldehído entre las proteínas nucleares y la cromatina se revirtió mediante calentamiento a 94°C y posteriormente las muestras se trataron con NaCl 100 mM y proteinasa K durante 1 hora a 37°C. La actividad de la proteinasa K se paró y las muestras se centrifugaron. Los sobrenadantes se utilizaron para la detección de los fragmentos de ADN inmunoprecipitados mediante amplificación por PCR a una temperatura de anillamiento de 58°C. Los cebadores empleados se seleccionaron de tal modo que mapearan los fragmentos de sitios de unión de factores de transcripción Smad en los promotores de los genes *Id1* (-1043/-730) y *PAI-1* (-798/-477) en el caso de tratamientos con FK506 y de Smad/Sp1 en el promotor de *Endoglin* (-147/+7) en el caso de tratamientos con Raloxifeno.

8. Ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA)

Los extractos nucleares de las células HUVECs tratadas y sin tratar con FK506 se obtuvieron mediante el Kit comercial *Nuclear Extract Kit* (Active Motif). Las sondas se diseñaron en la región -50/24 del promotor de *ENG*, abarcando dos sitios consenso para Sp1. Se diseñaron dos parejas de sondas de ADN de doble cadena (ADNdc): I) Secuencia original; -50/-24, 5'-GCAGGCGGCTGGGCCAGCCCCTTCTC-3'; II) Secuencia mutada -50/-24, Sp1-Mut 5'-GCAGGCGGCTGGGTTTAGCCCCTTCTC-3'. Las sondas se sintetizaron anillando los dos oligonucleótidos complementarios de las cadenas 5'-3' y 3'-5', en concentración 50 ng/μl cada uno, mediante calentamiento a 95°C durante cinco minutos y bajada progresiva de la temperatura hasta alcanzar

temperatura ambiente en tampón de anillamiento M (Roche Diagnostics). El marcaje radiactivo de la sonda con la secuencia original se realizó marcando el extremo 5' de cada una de las cadenas de oligonucleótido con [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP y la polinucleótido quinasa del fago T4 a 37°C durante una hora. Transcurrido este tiempo el [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP no incorporado se eliminó mediante el kit *Qiaquick Nucleotide removal kit* (Qiagen). Aproximadamente, 5 ng (100.000 c.p.m.) de cada sonda se incubaron con 10 μg del extracto nuclear para cada condición y con 2 μg de poli dIdC como competidor inespecífico (para eliminar proteínas que puedan unirse de modo inespecífico al ADN por interacciones electrostáticas) durante 30 min a 4°C. Para los ensayos de competición específica, las sondas sin marcar se añadieron a la reacción a una concentración cien veces superior a la marcada radiactivamente. Para la identificación específica del factor unido a la sonda, se realizaron ensayos de super-retardo por adición de anticuerpo (*supershift*). Con este fin, el lisado proteico nuclear de células HUVECs se incubó con 1 μg de anticuerpo anti-Sp1, anti-Smad3 o anti-Smad4 durante una hora a 4°C, antes de la adición del resto de componentes de la reacción de unión. Como control positivo, para localizar la posición de la banda correspondiente a Sp1, se realizó en paralelo un ensayo de unión con una sonda de la misma medida en número de pares de bases del promotor de *ENG* (-50/-24), con sitios Sp1 previamente descritos y funcionalmente comprobados (Botella y col., 2001). Las reacciones de unión de proteínas nucleares a la sonda de ADN se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% en TBE en condiciones no desnaturalizantes (sin SDS) a 4°C. El gel se secó por calor (*BioRad Gel Air Dryer*) y las bandas se visualizaron por autorradiografía.

9. Ensayo de migración y angiogénesis

9.1 Ensayo de reparación de herida o *Wound healing*

Se practicaron rayas con una punta de pipeta estéril, en placas de 24 pocillos con las células endoteliales en confluencia a lo largo de todo el pocillo y se observó la migración de las células para cerrar la herida a distintos tiempos. Las células se lavaron con tampón HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) (Gibco), y se cultivaron en medio EGM-2/EBM-2 con distintos tratamientos. Se tomaron fotografías desde las 3 horas hasta las 48 horas después de practicar la herida.

9.2 Ensayo de formación de tubos sobre Matrigel

Para el ensayo de formación de tubos, se sembraron 100.000 células HUVECs o HMEC-1 por pocillo de p-24, y se cultivaron a 37°C en medio EGM-2/EBM-2 sobre placas de 24 pocillos recubiertas de matrigel (Becton Dickinson) a una dilución 1/2 en medio DMEM sin SFB ni antibióticos. Se comenzaron a tomar fotografías de los pocillos a partir de 3 horas hasta las 12 horas después de haberlas sembrado.

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la aplicación del test t-Student. Los datos obtenidos se muestran como la media \pm SEM (error estándar de la media), calculado como $SEM = SD / \sqrt{n}$, donde SD es la desviación estándar, y n es el número de muestras. El cálculo de la SEM es válido para muestras con $n < 10$. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. En las figuras se indican con asteriscos los niveles de significación * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

En la actualidad los pacientes con Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria no tienen un tratamiento específico para la enfermedad. El síntoma más frecuente entre los pacientes (90% de los casos) son los sangrados nasales, primer síntoma en aparecer y que aumenta en frecuencia y cantidad con la edad, no cursando de la misma manera en todos los pacientes. Con el fin de encontrar un tratamiento eficaz que disminuya los sangrados notablemente sin crear efectos adversos, en el laboratorio hemos estudiado diferentes estrategias de actuación farmacológica en distintas rutas moleculares, para disminuir las epistaxis de estos pacientes.

1. Estrategia basada en la estimulación de la expresión de ENG y/o ALK1

La base molecular de la HHT es la haploinsuficiencia; da igual qué tipo de mutación ocurra en los genes de ENG y ALK1, el alelo mutado no va a dar lugar a una proteína funcional, existiendo en las células endoteliales de los pacientes, sólo la mitad de las proteínas Endogлина o ALK1, cantidad insuficiente para una adecuada angiogénesis. De esta manera, en esta primera estrategia, hemos buscado un posible aumento de expresión de los genes Endogлина y ALK1 tras los tratamientos que a continuación se exponen.

1.1 Raloxifeno

1.1.1 Los niveles de expresión de ENG y ALK1 aumentan en células endoteliales HMEC-1.

Tras los buenos resultados clínicos obtenidos en el Hospital de Sierrallana, nos planteamos elucidar el efecto *in vitro* de este modulador selectivo de estrógenos en células endoteliales para estudiar su mecanismo de acción. Los niveles de ambas proteínas se midieron mediante citometría de flujo y pudimos observar que tratamientos de 24h a diferentes dosis entre 0-10nM, provocan un leve incremento en los niveles de expresión de Endogлина y un incremento mayor en los niveles de ALK1 a

la concentración de 0,1nM, mientras que las dosis de 1 y 10nM disminuyen los niveles de ambas proteínas incluso más que en la situación control sin tratamiento de Raloxifeno (Figura 11A). Debido a este cambio en la expresión de Endoglina y ALK1 entre las dosis de 0,1-1nM, decidimos ampliar las concentraciones dentro de este rango, ensayando con 0,05nM, 0,1nM, 0,2nM y 0,5nM. Con estas nuevas dosis observamos que las células endoteliales mostraban un claro aumento en los niveles de expresión tanto de Endoglina como de ALK1 a la dosis de 0,2nM, siendo mayor en el caso de ALK1 (Figura 11B).

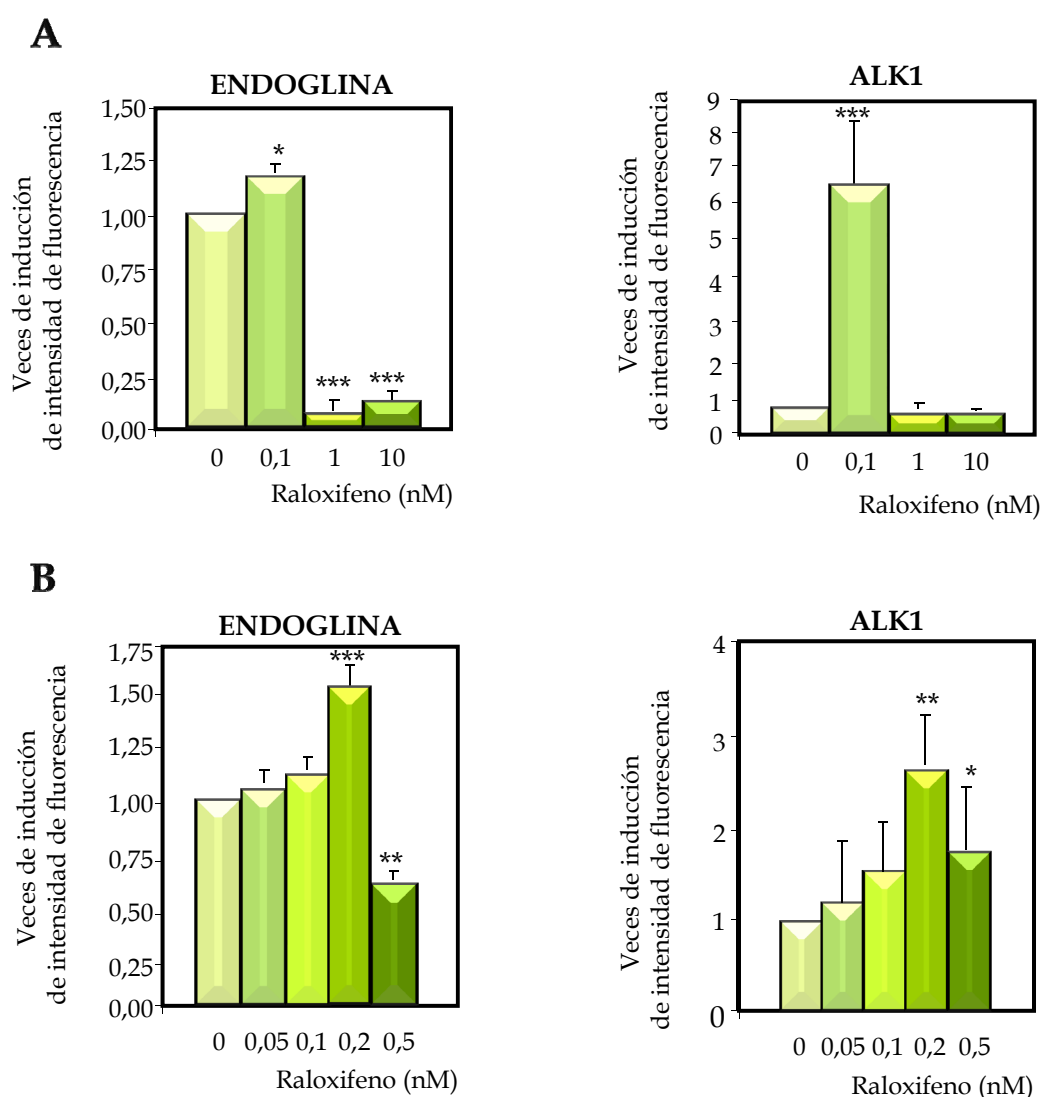


Figura 11. Raloxifeno aumenta los niveles de Endoglina y ALK1 en la superficie de las células endoteliales HMEC-1. **A)** Tras cultivar las células en presencia y ausencia de Raloxifeno (0-10nM) durante 24h, los niveles de ambas proteínas se midieron por citometría de flujo. Sólo se observa un aumento a la dosis de 0,1nM en ambas proteínas, disminuyendo la expresión en el caso de ENG en tratamientos de 1 y 10nM. **B)** Tratamientos entre 0-0,5nM, producen un aumento significativo a la dosis de 0,2nM en los niveles de ENG y ALK1 en membrana.

1.1.2 La actividad transcripcional del promotor de ENG y ALK1 aumenta

Para justificar este aumento en los niveles de ambas proteínas en superficie realizamos ensayos de PCR cuantitativa para estudiar si existía un efecto transcripcional o si, por el contrario, se trataba de un efecto postranscripcional, de estabilización del mensajero, de la proteína o bien a nivel del transporte de ésta a membrana. Para ello, partimos de ARNm total de células endoteliales HMEC-1 sin tratar o tratadas con Raloxifeno a la dosis de 0,2nM, durante 24 horas, y pudimos observar un aumento en los niveles del ARNm de hasta 1,6 y 2 veces de inducción en el caso de Endoglina y ALK1, respectivamente (Figura 12A).

Parecía que Raloxifeno estaba actuando a nivel transcripcional en el promotor de ambos genes así que decidimos realizar ensayos de transfección en células HMEC-1 con los vectores reporteros pCD105 y pALK1, que contienen los promotores de los genes de Endoglina y ALK1, obteniendo como resultado un aumento en la actividad de ambos promotores. La actividad luciferasa del reportero pCD105 aumentaba 3,5 veces mientras que pALK1 aumentaba 2,2 veces (Figura 12B). Tras este último ensayo se concluye que el aumento de Endoglina y ALK1 en la superficie de las células endoteliales se debe claramente a un efecto de estimulación en ambos promotores en el proceso de transcripción.

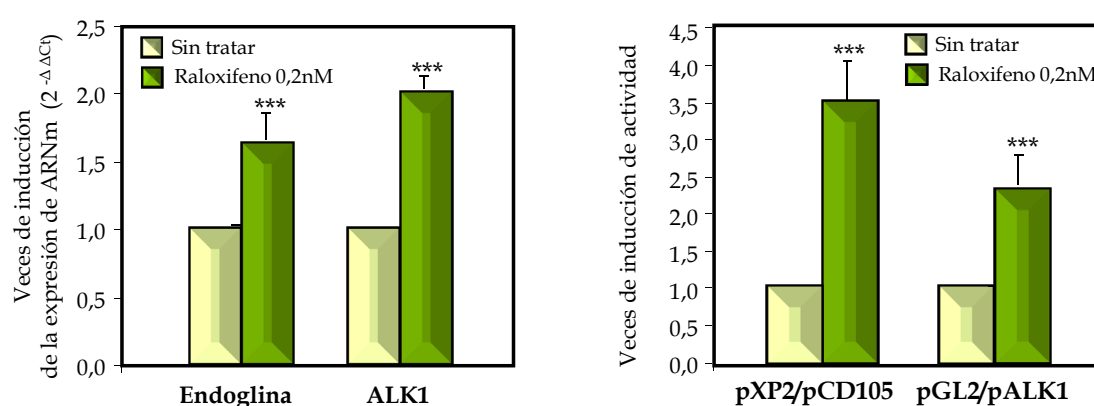


Figure 12. Raloxifeno provoca un incremento en la cantidad de transcritos de ARNm y en la actividad de los promotores de ambos genes. A) Ensayo de PCR a tiempo real donde se observa un aumento en los niveles de ARNm de ENG y ALK1 tras tratamiento de 24h con Raloxifeno 0,2nM comparados con los niveles del ARN ribosomal 18S. B) La actividad de los reporteros transfectados pXP2/pCD105 y pGL2/pALK1, que contienen secuencias de los promotores de ambos genes, aumentaba tras 24h con tratamiento de Raloxifeno 0,2nM comparando con la actividad en células sin tratar.

1.1.3 RE α se une al promotor de *ENG* asociándose con Sp1

Los SERMs son ligandos de los RE α que tienen propiedades agonistas o antagonistas al estradiol, el principal ligando natural de los receptores estrogénicos que promueve la inhibición de la reabsorción del hueso o la bajada de los niveles de colesterol en suero. Los efectos de estos análogos de estrógenos son distintos según los tejidos y dependen de las diferentes formas de interacción con el receptor y con otros co-activadores o co-represores unidos al promotor del gen. En células endoteliales, el mecanismo de transcripción estaría involucrado en el aumento de expresión de los genes de Endogлина y ALK1, como observamos en los resultados anteriores. Por ello, se intentó buscar el mecanismo de actuación del Raloxifeno sobre los promotores de ambos genes. Realizando un análisis teórico de sitios de unión de receptores de estrógenos en la secuencia de ambos promotores, no se encontró ninguna secuencia consenso ERE completa. Esta secuencia es una repetición palindrómica invertida: 5'-GGTCAnnnTGACC-3', donde n es cualquier nucleótido y tiene un tamaño aproximado de 17pb. Sin embargo, las secuencias flanqueantes también son importantes para determinar la afinidad con la cual el receptor de estrógeno se une a éstas (Noriega-Reyes y Langley, 2008). Sólo en el caso del promotor de Endogлина se encontraron medias secuencias consenso; GGTCА, GGTCА y TGACC en las posiciones -308,+44 y +182 respectivamente y no se encontró ningún elemento respuesta a Raloxifeno (RRE) (Rius y col., 1998). La mayoría de los genes que responden a estrógenos presentan secuencias imperfectas no-palindrómicas, y estos RE pueden estar favoreciendo la unión de otros factores al promotor del gen diana. Catalano y col en 2006, mostraron un ejemplo de este caso, con el efecto del Estradiol aumentando la actividad del promotor de FasL, mediante el reclutamiento de Sp1 por parte del RE α en células murinas Sertoli TM4. Sp1 es un factor imprescindible en la transcripción basal de Endogлина y ALK1 también para el efecto estimulador de TGF- β (Botella y col, 2001; Botella y col., 2002; Garrido-Martin., 2010). Por tanto, decidimos analizar la unión del receptor de estrógenos α (mayoritario en células endoteliales) al promotor proximal de Endogлина.

Para demostrar la unión de este receptor al promotor de Endogлина en la célula endotelial, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en cultivos de HUVECs. Se utilizó anticuerpo anti-ER α y anti-Sp1 y se amplificó la región comprendida entre -147/+7 ya que contiene un sitio de unión para el factor de

transcripción Sp1, imprescindible para la transcripción basal de Endogлина (Figura 13). Tras la amplificación por PCR pudimos comprobar que el RE α se encuentra unido a la región promotora amplificada, sin existir en ella secuencia ERE para su unión, por lo que Raloxifeno puede estar uniéndose a este RE α , y este complejo podría estar reclutando al factor Sp1 hacia sus secuencias de unión en el promotor de Endogлина al igual que ocurre en el promotor de FasL (Catalano y col., 2007).

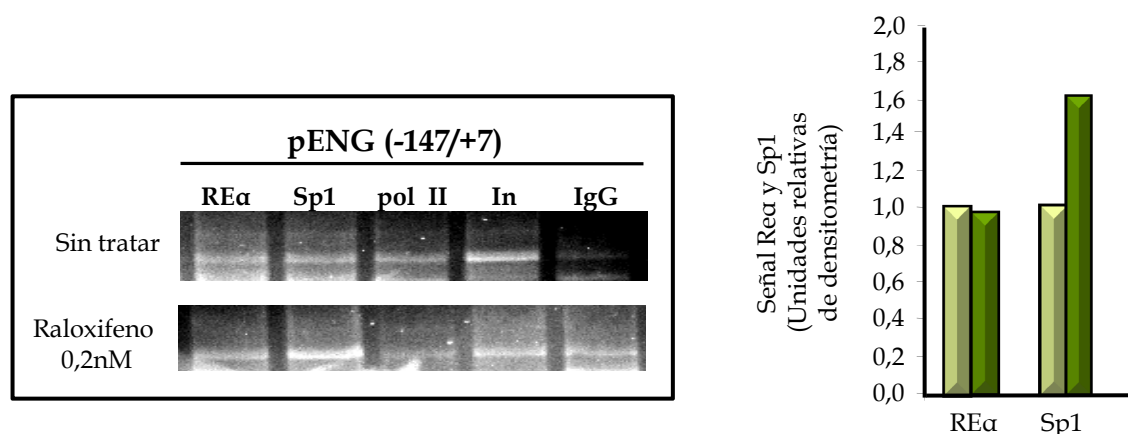


Figura 13. El complejo RE-Sp1 se une al promotor proximal de ENG en células endoteliales HUVECs. La cromatina de las células HUVECs tratadas con Raloxifeno 0,2nM, se digirió obteniendo fragmentos de tamaño 100-300 pb y se sometió a ChIP. Se utilizó anticuerpo anti-polimerasa II y una mezcla de IgGs de conejo como controles positivo y negativo de la inmunoprecipitación, respectivamente. El ADN procedente del lisado nuclear (*input*) fue cargado en el gel. La unión de los factores a la región del promotor amplificada se cuantificó mediante densitometría de las bandas obtenidas. Se representan las relaciones (Sp1-IgG)/In y (RE α -IgG)/In en cada condición.

1.1.4 Raloxifeno promueve la migración y la formación de tubos

Una vez estudiado el posible mecanismo de actuación del aumento de expresión de Endogлина tras el tratamiento con el análogo de estrógenos Raloxifeno, decidimos realizar dos tipos de ensayos funcionales con HMEC-1: ensayos de formación de tubos como estudio de la angiogénesis y ensayos de reparación de herida o *wound healing* como ensayo de migración celular.

Raloxifeno promueve un aumento en la velocidad de migración de las células endoteliales para cerrar el hueco dejado tras realizar una herida en la monocapa endotelial con una punta de pipeta. HMEC-1 tratadas con Raloxifeno cierran la discontinuidad tras 20 horas, mientras que sin tratamiento necesitan el doble de tiempo, entre 48 y 52 horas (Figura 14A).

En cuanto a la tubulogénesis, las células tratadas con Raloxifeno 0,2nM son capaces de formar una red más completa y compuesta por más tubos en menos tiempo (4h) que las células que no han sido tratadas, que necesitan alrededor de 8h. Podemos observar estas diferencias en la figura 14B, tanto en las fotos como en el gráfico, donde aparece el número de tubos completamente cerrados en cada condición. Por tanto, Raloxifeno es capaz de inducir la actividad angiogénica, como consecuencia de un aumento de expresión de las proteínas proangiogénicas Endoglina y ALK1, debido a un aumento de la actividad del promotor de ambos genes, y consecuentemente un efecto proangiogénico derivado de sus funciones.

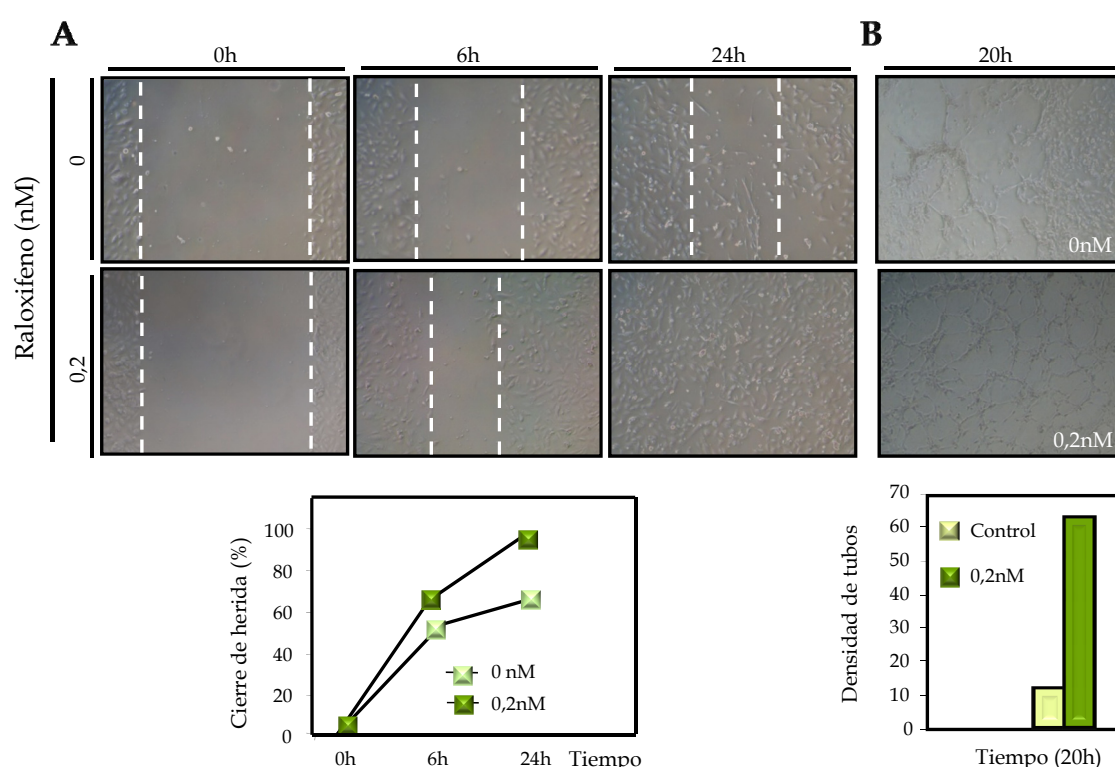


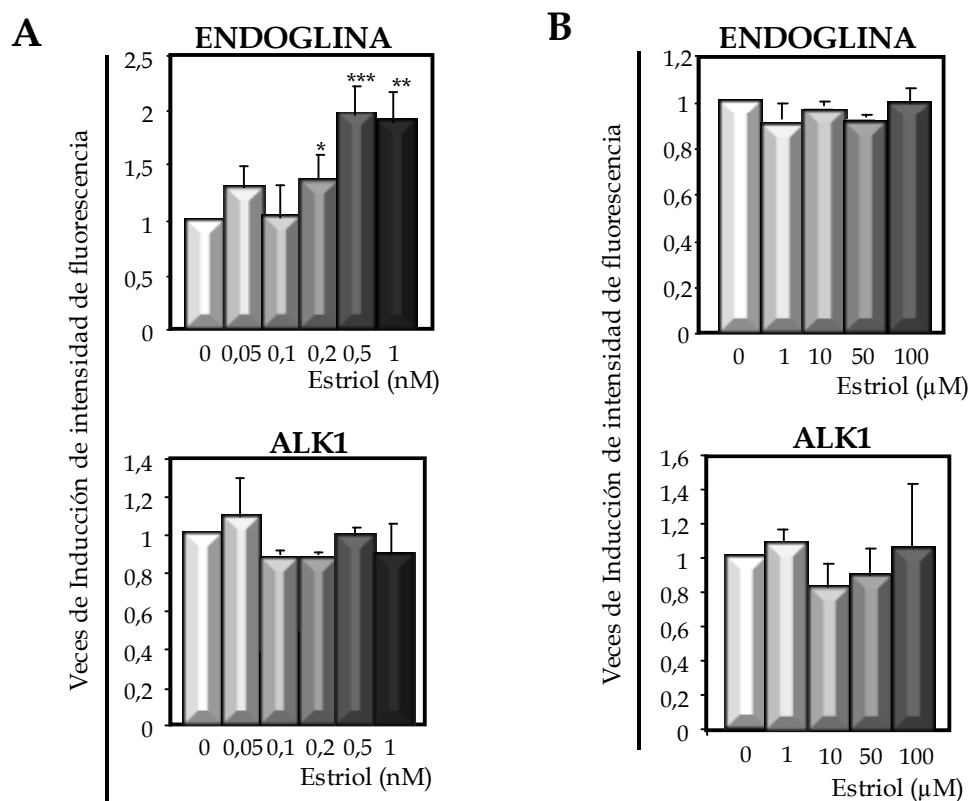
Figura 14. Raloxifeno promueve la migración y la formación de tubos en HMEC-1. A) Células tratadas con Raloxifeno 0,2nM a las que se les ha realizado una herida en la monocapa endotelial migran más rápido que las células sin tratamiento. Como se observa tanto en las imágenes como en el gráfico inferior la herida está completamente cerrada a las 24h. B) Tras 20h de tratamiento con Raloxifeno 0,2nM las células cultivadas a 37°C sobre matrigel forman una red tubular completa, mientras que las células sin tratar no tienen una estructura tan organizada y necesitan más tiempo para alcanzar este nivel como se muestra en las fotografías. En el gráfico inferior observamos el número de celdas completamente cerradas en la red tubular de cada condición.

1.2 Estriol

Sadick y colaboradores publicaron ensayos de pacientes HHT tratados con pomada con Estriol en su composición, mostrando un engrosamiento de la pared de la mucosa nasal y una disminución de las epistaxis (Sadick y col., 2005). Estos resultados y los nuestros con Raloxifeno, nos llevaron a estudiar los posibles efectos del Estriol sobre células endoteliales.

1.2.1 La expresión de ENG aumenta en HMEC-1 a dosis bajas de Estriol

Al medir la cantidad de proteína de ENG y ALK1 en la superficie celular de las células endoteliales HMEC-1 por citometría de flujo, observamos que sólo existen diferencias significativas en el caso de ENG. La expresión de esta proteína aumenta significativamente a partir de tratamientos de 0,2nM hasta 1nM Estriol, alcanzando un máximo de dos veces de inducción, algo que no ocurre al medir la expresión de ALK1, que no muestra diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 15A). También se realizaron tratamientos con dosis mayores que en el experimento anterior (1-100 μ M), no existiendo diferencias significativas para ENG ni tampoco para ALK1 (Figura 15B).



(Página anterior)

Figura 15. A) Bajas dosis de Estriol aumentan los niveles de Endoglina en células HMEC-1. Expresión de ENG y ALK1 medidas por citometría de flujo. Los niveles de ENG aumentan significativamente en la superficie de las células endoteliales a concentraciones desde 0,2nM hasta 1nM, mientras que si comparamos los niveles de ALK1 no existen diferencias significativas. **B)** Tratamientos con dosis de Estriol mayores de 1μM no afectan a los niveles de las proteínas Endoglina y ALK1.

1.2.2 Estriol disminuye la migración de células HUVEC

Se realizaron tratamientos con Estriol a células HUVECs en confluencia a las que se le realizó una raya o herida con una punta estéril de pipeta, y no se observó ningún efecto significativo en la migración celular a las dosis ensayadas de 0,2-10nM (Figura 16A). Sin embargo, cuando se ensayan dosis a partir de 10nM hasta 100μM observamos que a lo largo del experimento, existe un leve retraso en la migración de las células para cerrar la herida en las tres últimas concentraciones utilizadas de 10μM, 50μM o 100μM (Figura 17A). A estas dosis no existían diferencias significativas entre los niveles en membrana de Endoglina y ALK1 si los comparamos con las células sin tratar, por lo que este efecto en la disminución de la migración no puede ser atribuido a las proteínas Endoglina y ALK1.

1.2.3 La formación de tubos se reduce a dosis altas de Estriol

Este ensayo se realiza para medir la angiogénesis *in vitro*, y consiste en sembrar las células sobre una matriz de matrigel, compuesta por componentes necesarios presentes en la matriz extracelular. Como muestra la figura 16B, no hay diferencias significativas en la formación de la red tubular entre dosis de 0,1nM a 10nM si las comparamos con las células control. Al incrementar la concentración de las dosis de Estriol (10nM-100μM), se observa un efecto inhibitorio sobre las células HUVECs cuando reciben tratamiento de Estriol 100μM. La cantidad de tubos completamente cerrados que son capaces de formar es menor que en las células sin tratar o tratadas con el resto de dosis (Figura 17B). En conclusión, Estriol en el rango de dosis bajas (0,1-1nM), aumenta levemente la expresión de Endoglina, al igual que ocurre con tratamientos con Raloxifeno, sin embargo este aumento en proteína no es suficiente para que se traduzca en un efecto significativo en la inducción de la angiogénesis (ensayo de tubos) o en el cierre de la herida.

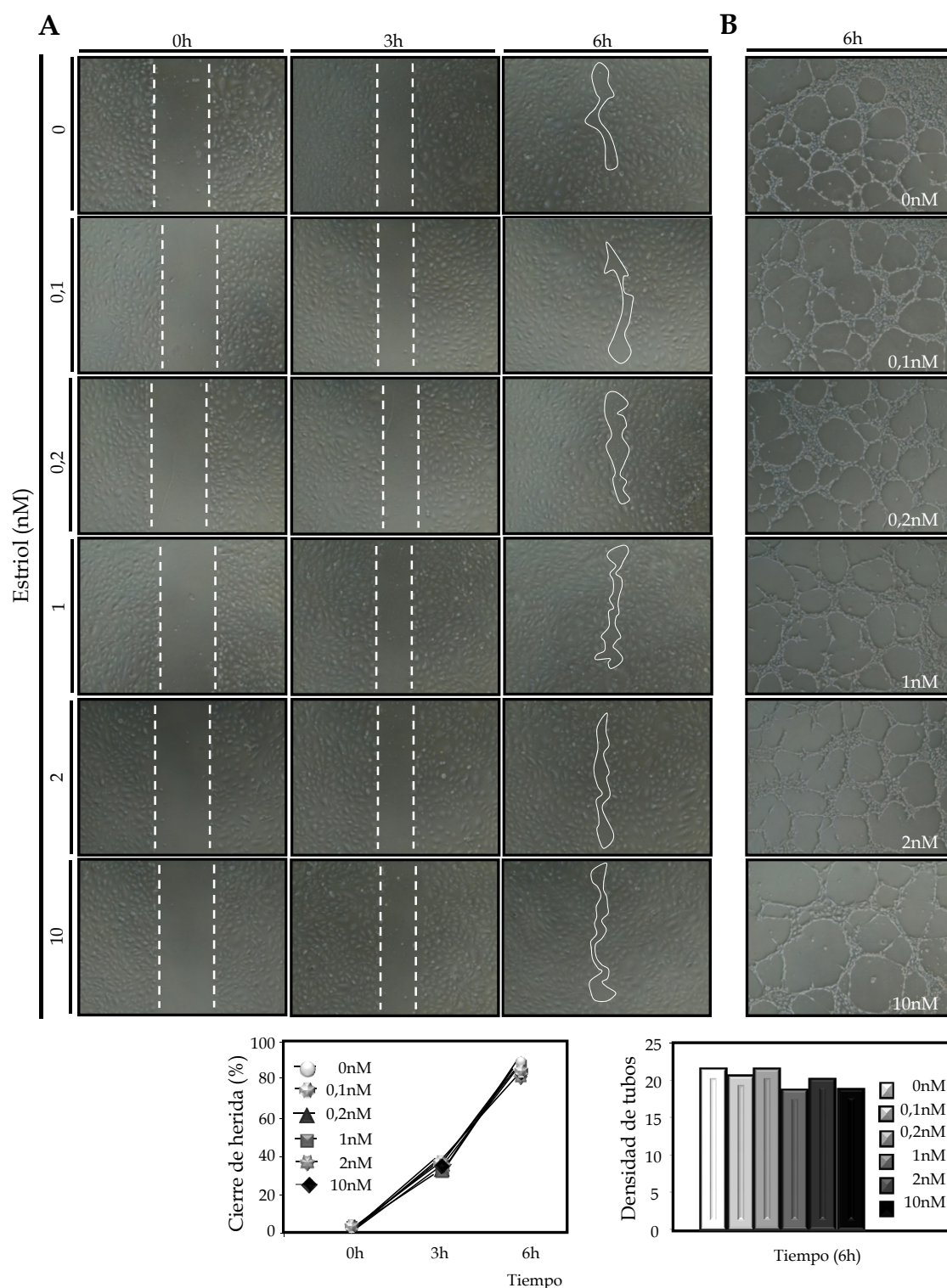


Figura 16. A) Ensayos de reparación de herida en HUVECs tratadas con Estriol 0,1nM-10nM. Se realizó una raya o herida con una punta de pipeta estéril a lo largo de los pocillos de una placa p24 a HUVECs en confluencia, no existiendo diferencias significativas en la migración entre tratamientos. **B) Ensayo de formación de tubos.** Tras sembrar HUVECs sobre matrigel se observa que no existen diferencias en la cantidad de redes tubulares formadas entre los distintos tratamientos realizados (0,1nM-10nM).

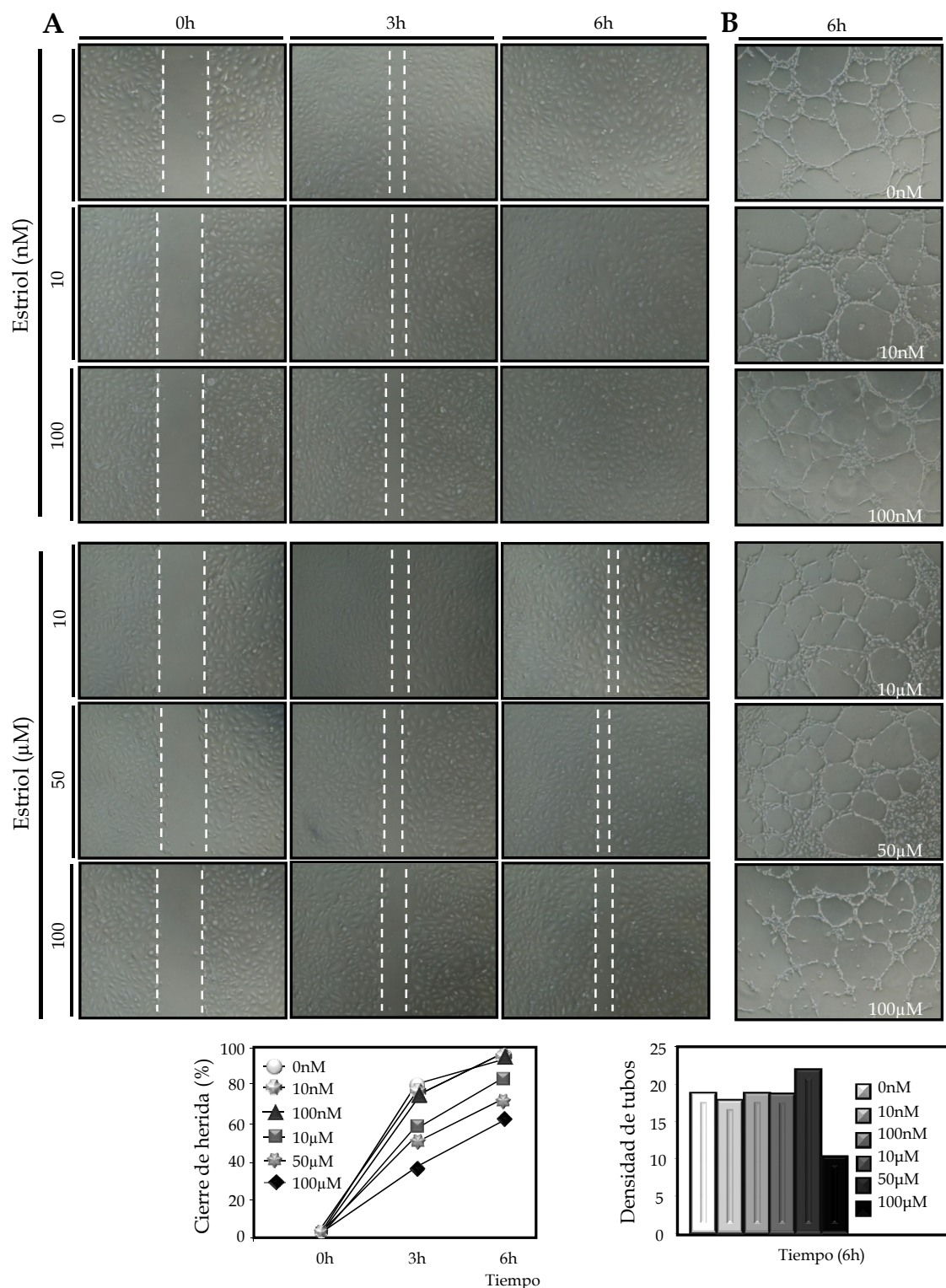


Figura 17. A) Ensayos de reparación de herida en HUVECs tratadas con Estradiol 10nM-100μM. Tanto las fotos y como el gráfico, no muestran diferencias en la migración celular para cerrar la herida tras tratamientos de 10nM-100nM pero si las hay en tratamientos de 10μM-100μM, observando diferencias significativas, en la disminución de la migración. B) **Ensayo de formación de tubos en HUVECs tratadas con Estradiol.** Tras sembrar HUVECs sobre una base de matrigel se observa que no existen diferencias en la cantidad de redes tubulares formadas entre los tratamientos realizados de 10nM-50μM y si se observa una disminución en esta formación tubular en tratamientos de Estradiol 100μM.

1.3 FK506

1.3.1 Aumento de la expresión de ENG y ALK1 en la membrana de células HMEC-1

Se ha estudiado el efecto del inmunosupresor Tacrolimus sobre las proteínas ENG y ALK1 en cultivos de células endoteliales HMEC-1 tras 24h de tratamiento con dosis entre 0-100 ng/ml de FK506. El nivel de Endogлина en la superficie de las células HMEC-1 aumenta hasta 1,8 veces con la dosis más alta utilizada de 100 ng/ml, mientras en el caso de ALK1 el incremento es de 1,6 veces (Figura 18A). Las dosis ensayadas menores de 100 ng/ml no muestran diferencias estadísticas significativas entre células tratadas y sin tratar (resultados no mostrados), por lo que el resto de ensayos se han realizado con esta dosis. Como controles positivos se han usado tratamientos de TGF- β 1 (10ng/ml) o Raloxifeno (0,2nM) durante 24h, obteniendo un aumento en los niveles aproximado al que produce FK506.

1.3.2 FK506 aumenta los niveles de ARNm de ENG y ALK1 activando la expresión de ambos promotores

Dado que los niveles de ambas proteínas presentes en células endoteliales HMEC-1 experimentan un aumento en su expresión tras tratamiento con FK506, se estudiaron los niveles de ARN mensajero de estos genes para ver si un aumento en estos niveles era la razón del aumento en membrana. Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real demuestran que FK506 estimula el aumento en los niveles de expresión de ENG y ALK1 hasta un máximo de 2,5 y 2,4 veces respectivamente (Figura 18B). FK506 no sólo aumenta los niveles de proteína sino también los de ARNm, así que se ha estudiado si estos efectos eran debidos a que este fármaco estuviera afectando la actividad de ambos promotores. Células HMEC-1 se transfectaron con los vectores reporteros que contienen ambos promotores, observándose que las células tratadas con FK506 muestran una estimulación del promotor mayor que en células sin tratar, 3 veces en el caso de ENG y 1,6 veces en el caso de ALK1. Tratamientos con TGF- β 1 y Raloxifeno fueron realizados como controles positivos para la estimulación del promotor (Figura 18C).

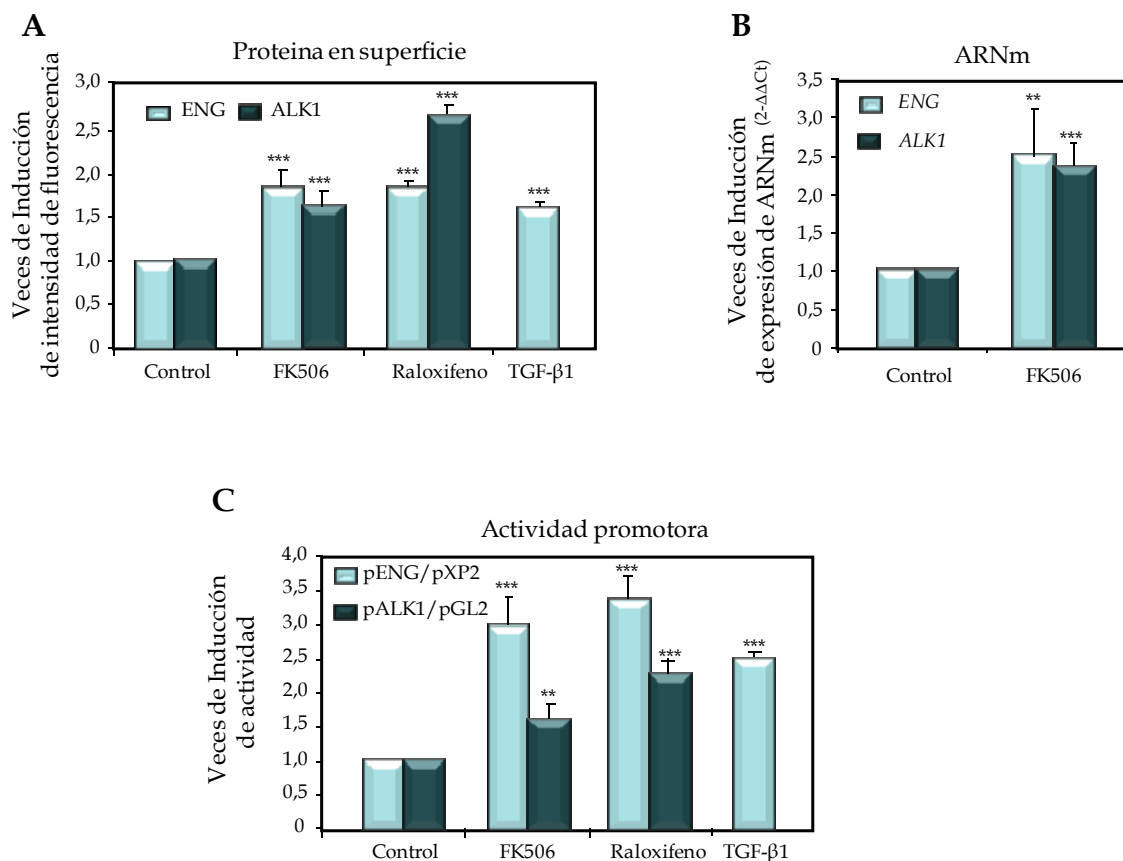


Figura 18. FK506 aumenta la expresión de las proteínas de ENG y ALK1 mediante la activación de sus promotores. **A)** Células HMEC-1 se cultivaron en presencia o ausencia de FK506 (100 ng/ml) durante 24h, dando lugar a un aumento de expresión de ambas proteínas en la superficie celular tal y como se observa en ensayos de citometría de flujo. **B)** Ensayos de PCR cuantitativa demostraron un incremento también en los niveles de ARNm en células HMEC-1. Estos experimentos se llevaron a cabo mediante extracción de ARN total y retrotranscripción para amplificación del mismo. Los niveles de transcritos de ENG y ALK1 se compararon con los del ARN ribosomal 18S. **C)** HMEC-1 fueron transfectadas con los vectores reporteros pCD105 o pGL2 que contienen secuencias de los promotores de ENG y ALK1 respectivamente. La actividad de ambos reporteros aumenta cuando las células endoteliales son tratadas con FK506. Tratamientos con TGF-β1 (10 ng/ml) o Raloxifeno (0,2nM) se incluyen como controles positivos.

1.3.3 La señalización de TGF-β1 en células endoteliales es modulada por FK506.

Giordano y colaboradores mostraron que el FK506 activaba la vía TGF-β1/ALK5 en células musculares lisas de vasculatura ya que aumentaba la fosforilación de las proteínas Smad2/3, mediadoras de esta vía (Giordano y col., 2008). Este efecto se explica porque FK506 se une a su receptor citoplasmático; nucleofilina FKBP12, inhibidor a su vez del receptor I de TGF-β1. Cuando FK506 se une a FKBP12, el RI se

libera de su inhibidor, aumentando su actividad quinasa, y como consecuencia la fosforilación de las proteínas Smad. Ya que habíamos observado que los niveles de proteína y ARNm están aumentados tras tratamiento con FK506, la hipótesis de trabajo fue que el mecanismo de acción por el que actúa este inmunosupresor es similar en células musculares y en células endoteliales. FK506 actúa modulando la vía de TGF- β 1. BRE-luc y CAGA-luc son vectores reporteros específicos de las rutas TGF- β 1/ALK1 o TGF- β 1/ALK5 respectivamente, que contienen promotores artificiales con secuencias consenso de unión de proteínas Smad. BRE-luc está formado por dos sitios GTCT (*BRE: Bone morphogenetic protein responsive element*) donde se van a unir las pSmad 1/5/8, y CAGA-luc está formado por 12 secuencias CAGA, donde se van a unir pSmad2/3. Ambas secuencias se encuentran seguidas por el gen de la luciferasa en el vector pGL3. Las células HMEC-1 se transfectaron con BRE-luc y CAGA-luc, y fueron cultivadas en ausencia o presencia de 100 ng/ml de FK506. Se observó como este fármaco aumenta la actividad del vector reportero BRE-luc y disminuye la de CAGA-luc. Como control positivo de activación de ambas rutas de TGF- β se realizaron tratamientos de 1 ng/ml durante 3h (activación de TGF- β 1/ALK1), y 10 ng/ml durante 24h (activación de TGF- β 1/ALK5). Los resultados obtenidos sugieren que FK506 modula la señalización de TGF- β 1, estimulando la vía TGF- β 1/ALK1/Smad1/5/8 e inhibiendo la vía TGF- β 1/ALK5/Smad2/3 (Figura 19A).

Los resultados se confirmaron con las transfecciones de los reporteros que contienen secuencias de los promotores naturales de los genes *Id1* (pId1-luc) y *PAI-1* (p800-luc) que son activados por ALK1 y ALK5 respectivamente. Observamos actividades promotoras similares si las comparamos con BRE-luc y CAGA-luc, apoyando que FK506 esté actuando vía TGF- β 1/ALK1/Smad1/5/8 (Figura 19B).

1.3.4 La fosforilación de Smad1 y la traslocación de Smad4 al núcleo aumentan tras tratamiento de FK506.

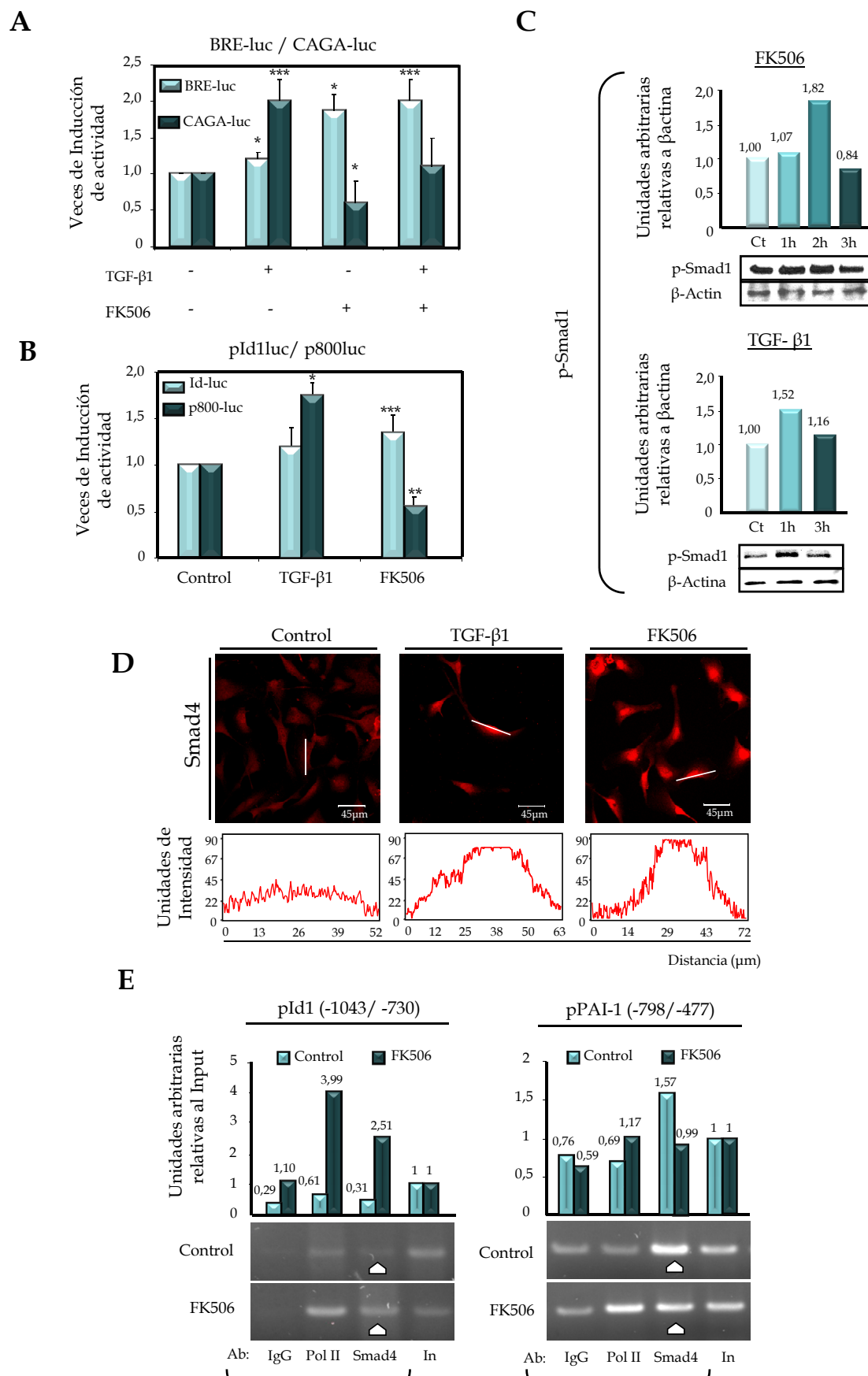
Se estudiaron los niveles de fosforilación de Smad1 tras tratamientos con FK506 (100 ng/ml) y TGF- β 1 (1 ng/ml) durante periodos de tiempo cortos de 1 a 3 horas, observándose una mayor cantidad de proteína fosforilada a las dos horas de tratamiento con el inmunosupresor y tras 1 hora con TGF- β 1 (Figura 19C). Con los mismos extractos se realizaron pruebas para medir los niveles de pSmad2/3 y no se

encontraron diferencias en la fosforilación tras tratamiento con FK506 (datos no mostrados).

Este comportamiento en células endoteliales difiere del que acontece en células musculares (Giordano y col., 2008) dónde FK506 al secuestrar a FKBP12 que inhibe al receptor I de TGF- β 1, ALK5, aumenta la fosforilación de Smad2/3. Ese comportamiento diferencial se debe a los distintos tipos de receptores I que actúan mayoritariamente en cada tipo celular. Mientras que en células musculares de la vasculatura, FK506 activa la señalización a través de ALK5, en células endoteliales parece estar actuando mediante el receptor I específico de estas células, ALK1. Para apoyar estos resultados se han realizado ensayos de microscopía de fluorescencia estudiándose la traslocación de Smad4 al núcleo. Cuando la ruta está activa, las proteínas R-Smad son fosforiladas por el RI y se unen a la Smad cooperadora Smad4 para activar la expresión de genes diana. Se observó que en células sin tratar, la Smad cooperadora Smad4 se encontraba distribuida por el citoplasma, sin embargo tras tratamientos con TGF- β 1 o FK506, Smad4 se traslocaba al núcleo (Figura 19D). Estos resultados sugieren que FK506 promueve la vía TGF- β 1/ALK1/Smad1.

(Página siguiente)

Figura 19. FK506 activa la ruta de señalización TGF- β 1/ALK1/pSmad1 en células endoteliales HMEC-1. **A)** La gráfica muestra los niveles de activación de los vectores reporteros BRE-luc (TGF- β /ALK1) y CAGA-luc (TGF- β /ALK5) transfectados en células HMEC-1. Tras 24h de tratamiento con FK506, los niveles de BRE-luc, se muestran aumentados, mientras los de CAGA-luc, aparecen disminuidos. Ambos reporteros aumentan su actividad cuando las células HMEC-1 son tratadas con TGF- β 1. **B)** El gráfico muestra los niveles de activación de los vectores reporteros pId1-luc y p800-luc. **C)** Ensayos de western blot realizados con lisados de células endoteliales HMEC-1. FK506 aumenta la fosforilación de Smad1 al igual que ésta también aumenta con tratamiento de TGF- β . El gráfico muestra la densitometría de las bandas de pSmad1 relativizado a β -actina como control de carga. **D)** Las imágenes de microscopía de inmunofluorescencia muestran cómo FK506 induce la traslocación nuclear de Smad4, consecuencia de la activación de la ruta de TGF- β 1. Células que no reciben tratamiento muestran Smad4 distribuido por el citoplasma, como se observa en el gráfico de intensidad de señal de la sección longitudinal de una célula representativa de cada condición (indicada con una línea blanca). **E)** FK506 modula la unión de Smad4 a los promotores de los genes *Id1* y *PAI-1*. Los histogramas revelan los resultados de la inmunoprecipitación de cromatina realizada con HUVEC con o sin tratamiento de FK506. Smad4 es capaz de inmunoprecipitar más cantidad de promotor de *Id1* que de *PAI-1* (flechas blancas). Se muestra la densitometría de bandas relativizadas frente al ADN input (de partida).



1.3.5 FK506 modula la unión de Smad4 a los promotores de *Id1* y *PAI-1*

Como se muestra en la figura 19E, en células HMEC-1 tratadas con FK506, existe un aumento en los niveles de traslocación de Smad4 al núcleo. Smad4 puede traslocarse unido a pSmad1/5/8 o a pSmad2/3. Ya que en resultados anteriores habíamos observado mediante los vectores reporteros de la vía ALK1/pSmad1/5 (BRE-luc, *Id1*-luc) o ALK5/pSmad2/3 (CAGA-luc, p800-luc) que FK506 actuaba por la vía de ALK1 y no por la de ALK5, (Figura 19A,B), para reforzar la especificidad de FK506 se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con Smad4, seguida de análisis de PCR con parejas de cebadores para los promotores de los genes *Id1* y *PAI-1*, ya que ambos contienen secuencias de unión a proteínas Smads. La cantidad de DNA del promotor de *Id1* inmunoprecipitado con Smad4 es mayor en el caso de células tratadas con FK506 que en el caso de células sin tratar (2,5 versus 0,31). Por el contrario la cantidad de DNA del promotor de *PAI-1* inmunoprecipitado es menor en el caso de las células tratadas (0,99 versus 1,57) (Figura 19E). Estos resultados confirman que FK506 está modulando la ruta de señalización de TGF- β 1, mediante la activación de la ALK1/pSmad1/5 e inhibición de ALK5/pSmad2/3.

1.3.6 Aumento de la unión del complejo Sp1/Smad4 a la región proximal del promotor de *Endogлина*

El promotor proximal de *Endogлина*, contiene sitios de unión funcionales para el factor de transcripción Sp1 (-50/-24), esenciales para su actividad transcripcional basal. Este sitio se encuentra junto a un elemento de unión para proteínas Smad, por lo que existe una sinergia funcional debido a la cooperación entre ambos factores en la estimulación de la transcripción de *Endogлина* (Botella et al., 2001). FK506 parece activar la vía de TGF- β 1/ALK1 aumentando los niveles de fosforilación de Smad1. A fin de estudiar, si el tratamiento con FK506, facilitaba la unión del complejo Sp1/Smad a la región -50/-24 del promotor de *Endogлина*, aumentando así su actividad transcripcional, células endoteliales HUVEC se cultivaron en presencia o ausencia de FK506, para usar los extractos nucleares en ensayos de movilidad electroforética retardada (EMSA). La figura 20A muestra que el complejo formado en células tratadas o no con FK506 es muy similar después de 24h (Figura 20A, columnas 2 y 3) y que no hay aumento en la intensidad de la banda (columna 3). Como se muestra en las columnas 4 y 5, con las

competiciones con exceso de sonda no-radioactiva normal y mutada, las bandas son específicas para este complejo. El complejo contiene Sp1 junto a Smads, como se observa tras la incubación con anticuerpos para estas proteínas, en las columnas 6 y 7. Al no encontrarse diferencias en la intensidad de este complejo tras 24 horas de cultivo con FK506, se realizaron tratamientos de menor duración, y como se muestra, las bandas correspondientes a tratamientos de 3h con FK506, son más intensas, disminuyendo la intensidad en tratamientos de mayor duración (Figura 20B). Los resultados muestran que la eficiencia de unión del complejo Sp1-Smad al promotor de *Endoglina* aumenta en presencia del inmunosupresor FK506.

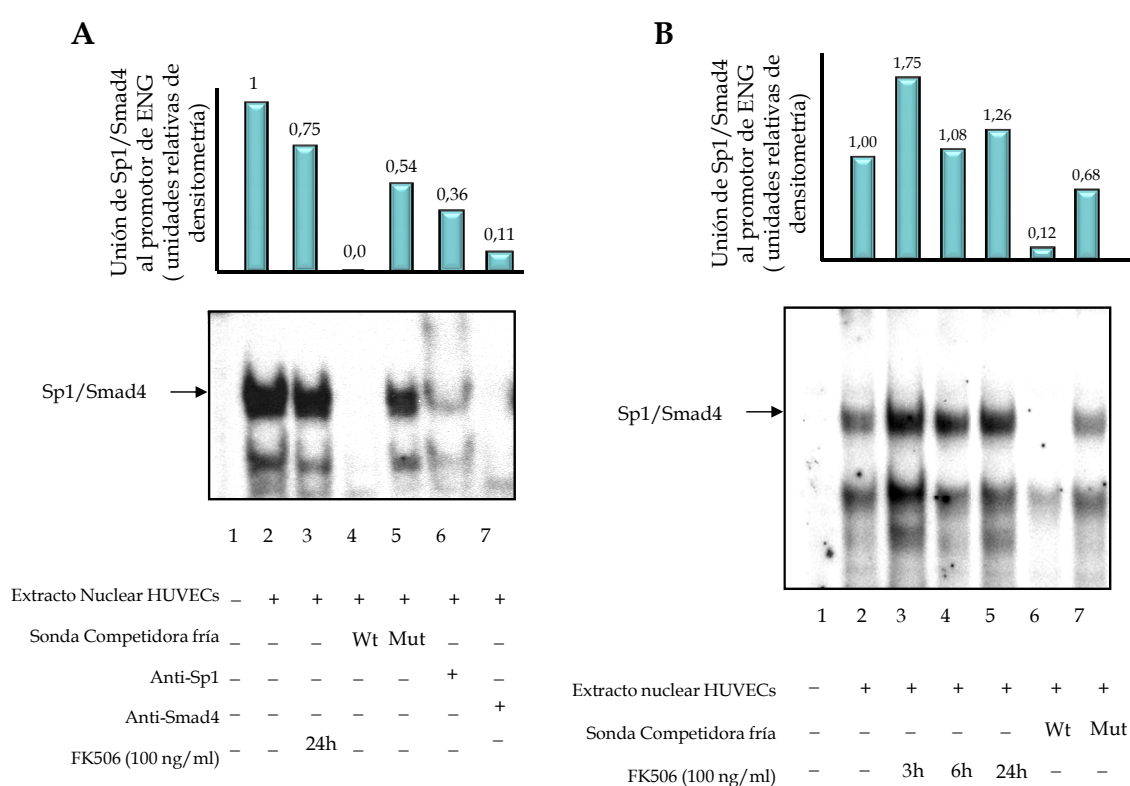
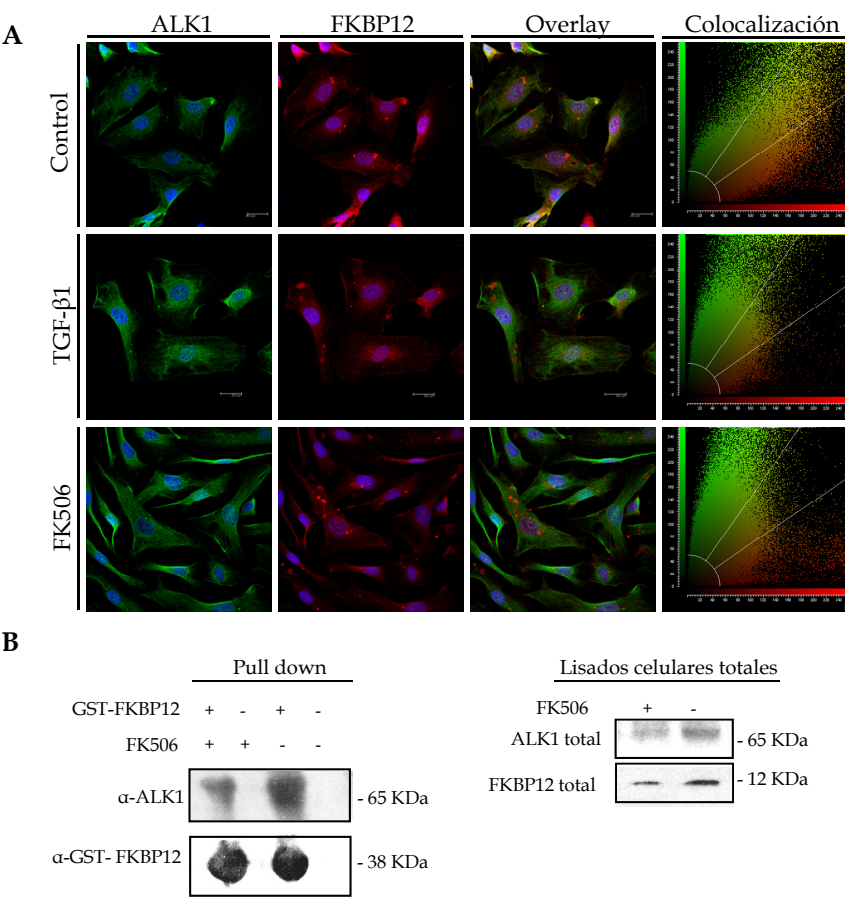


Figura 20. FK506 aumenta la unión del complejo Sp1/Smad a la región proximal del promotor de *Endoglina*. Se muestra el ensayo de movilidad electroforética retardada (EMSA) con extractos nucleares de HUVEC sin tratar y tratadas con FK506 (100 ng/ml), incubados con una sonda del promotor de *Endoglina* marcada radioactivamente. Como controles negativos del ensayo se realizaron incubaciones con sonda sin marcar y con sonda mutada, ambas en exceso. **A)** En la imagen se muestra la caracterización del complejo Sp1/Smad4, mediante anticuerpos específicos anti-Sp1 y anti-Smad4. La intensidad de este complejo disminuye tras la incubación con anti-Sp1, apareciendo incluso una banda de super-retardo, y desapareciendo completamente las bandas tras la incubación con anti-Smad4. **B)** Tanto el gráfico como la imagen muestran que, la unión del complejo Sp1-Smad4 aumenta tras tratamientos de 3h, con FK506.

1.3.7 FKBP12 colocaliza y coprecipita con ALK1

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en HUVECs para estudiar la posible colocalización de ALK1 y su inhibidor FKBP12. Tal y como se muestra en la figura 21A en células sin tratar, existe colocalización entre ambas proteínas, resultado también observado por Giordano y col en células musculares de vasculatura donde la colocalización se daba entre FKBP12 y ALK5 (Giordano y col., 2008). Este ensayo sugiere que FKBP12 está unido a ALK1, interfiriendo con la señalización del receptor. Cuando las células son tratadas con TGF- β 1 o FK506, esta colocalización desaparece porque ALK1 se une preferencialmente a su ligando en vez de al inhibidor y FK506 secuestra a FKBP12, dejando ALK1 libre para la unión de su ligando TGF- β 1 (Figura 21A). Para elucidar si existe interacción física entre FKBP12/ ALK1, lisados proteicos de HUVECs se sometieron a ensayos de arrastre (*pull down*) con GST-FKBP12. Como se muestra en la figura 21B, ALK1 coprecipita con la inmunofilina FKBP12 recombinante. Además, la cantidad de ALK1 que se recoge con GST-FKBP12 es menor en células tratadas con FK506, como ocurre en el experimento de colocalización (Figura 21A), apoyando la hipótesis de la asociación directa entre ALK1 y FKBP12.



(Página anterior)

Figura 21. FKBP12 colocaliza e inmunoprecipita con ALK1. A) Cultivos primarios de células HUVEC con tinción de ALK1 (fluorescencia verde), FKBP12 (fluorescencia roja) y núcleo (DAPI-azul). En la última columna se muestra el gráfico de colocalización, con el área de colocalización en el centro, que sólo existe en células no tratadas, donde FKBP12 está actuando como inhibidor de ALK1. Cuando las células son tratadas con FK506 o TGF- β , la colocalización desaparece, desplazando a FKBP12. **B)** Se muestra el arrastre (*pull down*) de ALK1 con la proteína GST-FKBP12, donde observamos que ALK1 coprecipita con FKBP12, demostrando la interacción entre ellos en estas células. El control negativo se realizó con proteína GST sola.

1.3.8 FK506 aumenta la migración celular en ensayos de reparación de herida en células HMEC-1.

En el ensayo de reparación de herida, cuando las células HMEC-1 se encontraron totalmente confluentes, se les realizó una herida o raya con la punta de una pipeta, y tras cultivarlas en las horas siguientes en ausencia o presencia de FK506, observamos que este fármaco es capaz de promover la migración de las células endoteliales. Mientras que la herida se cierra entre las 20-24h en células tratadas, las células control necesitan entre 40-44h para cerrar la herida completamente. El aumento de migración de estas células endoteliales y el efecto proangiogénico observado en ambos ensayos funcionales, son consecuencia del efecto estimulador del FK506 que aumenta la cantidad de ENG y ALK1 y también la función promovida por estas proteínas (Figura 22A).

1.3.9 FK506 aumenta la formación de tubos en células HMEC-1.

Tras sembrar las células endoteliales en placas de 24 pocillos tapizados por matrigel, observamos diferencias en la formación de la red tubular de HMEC-1, ya que mientras las células tratadas con FK506, desarrollan esta red completamente a las 3 horas, las células que no reciben tratamiento necesitan más tiempo (8h) y pierden la conexión intracelular antes que las células que han recibido tratamiento (10h) (Figura 22B). FK506, al aumentar los niveles de las proteínas ENG y ALK1 en la superficie de las células endoteliales, promueve efectos proangiogénicos y migratorios, como podemos observar en los resultados mostrados.

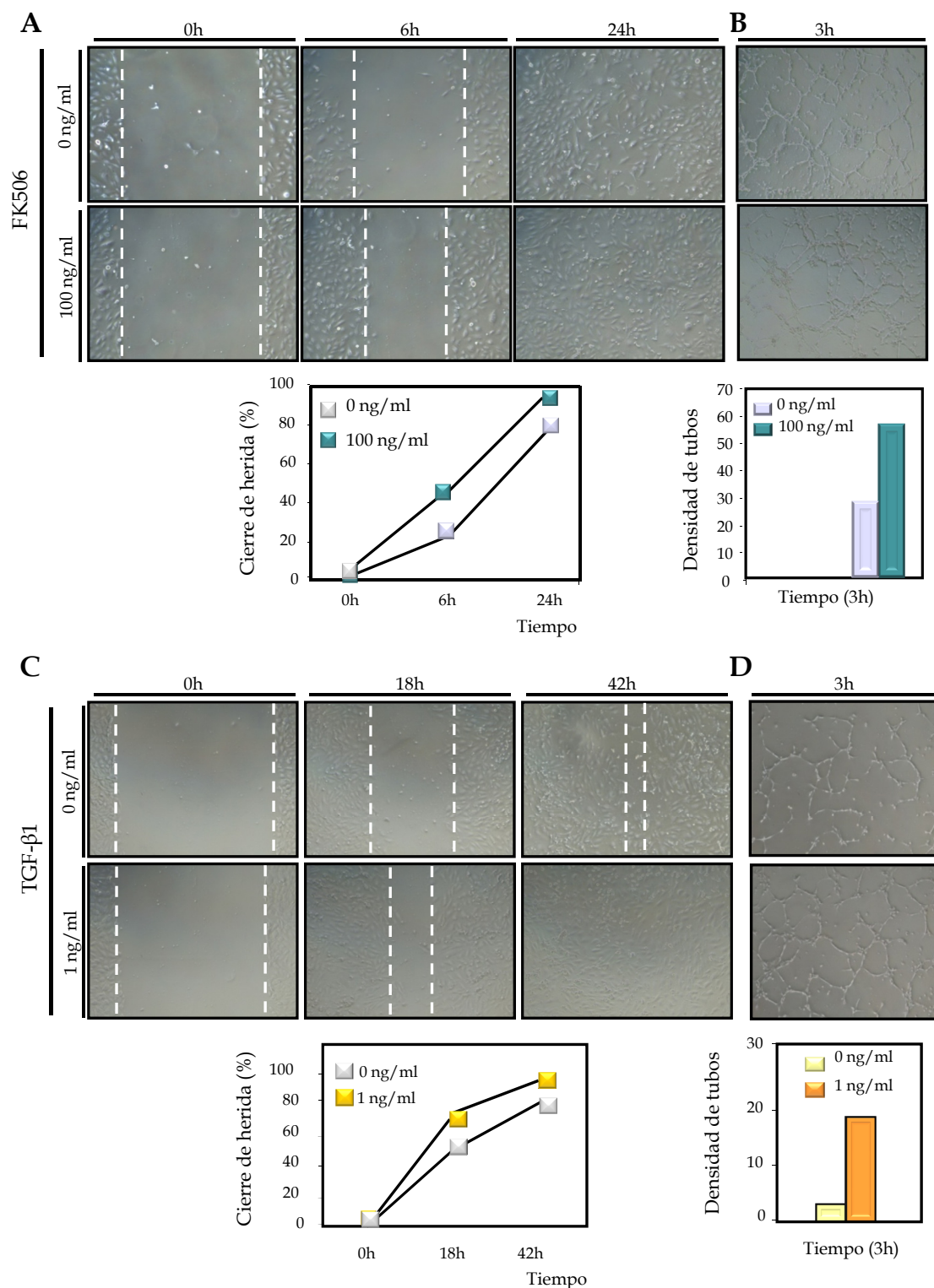


Figura 22. FK506 aumenta la formación de tubos y la migración celular. A) Las imágenes muestran células HMEC-1 en estado de confluencia, tratadas o sin tratar con FK506 (100 ng/ml) a las que se practica una herida con una punta de pipeta. Observamos cómo las células tratadas cierran antes la herida que las células sin tratar. B) Sobre placas con matrigel, las células tratadas con FK506, muestran una red completa de tubos cerrados que se alcanza prácticamente a las 3h del tratamiento, mientras que células sin tratar forman todavía una red incompleta con más tubos sin cerrar. C,D) Tratamiento con TGF-β1 (1 ng/ml) se realizaron como controles positivos, aumentando la formación de la red tubular y la velocidad de migración, al comparar con células sin tratar.

1.4 N-acetilcisteína

Tras los resultados publicados por Gussem y colaboradores dónde se describe que tratamientos de NAC mejoran los sangrados en pacientes de HHT, decidimos tratar de buscar la posible justificación molecular (de Gussem y col., 2009).

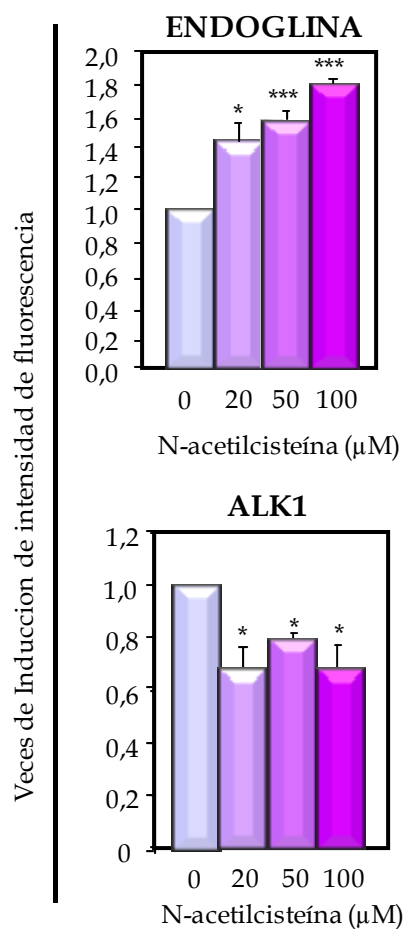
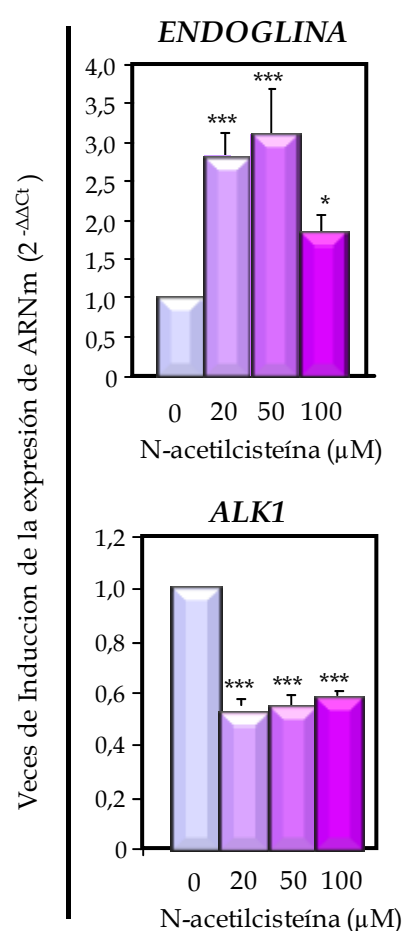
1.4.1 El tratamiento con N-acetilcisteína aumenta los niveles de ENG y disminuye los de ALK1.

Células endoteliales HMEC-1 fueron tratadas con NAC durante 48h y mediante citometría de flujo se obtuvo como resultado un aumento en los niveles de Endogлина en superficie. Estos niveles experimentaron un incremento gradual de 1,42, 1,58 y 1,8 veces respecto a las células sin tratar a concentraciones de 20μM, 50μM y 100μM, respectivamente. En cuanto a la cantidad de ALK1 en membrana celular, se observó una tendencia a disminuir la expresión tras tratamiento con NAC, observándose una bajada significativa de hasta 0,7-0,8 en los niveles de ALK1 (Figura 23A).

Tras medir los niveles de ambas proteínas en la superficie celular de las células endoteliales HMEC-1, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real con la finalidad de estudiar si las cantidades de ARNm se comportaban igual que los niveles de proteína tras los tratamientos con NAC. Tras 24 horas de tratamiento con este antioxidante, los resultados fueron similares a los del ensayo de citometría de flujo. Los niveles de ARNm de Endogлина aumentan hasta 2,8, 3,1 y 1,9 veces en tratamientos de 20μM, 50μM y 100μM, respectivamente. Al medir la cantidad de ARNm de ALK1, se observa que el tratamiento con NAC disminuye aproximadamente a la mitad los niveles con las dosis de 20μM, 50μM y 100μM (Figura 23B).

(Página siguiente)

Figura 23. N-acetilcisteína aumenta la expresión de Endogлина y disminuye la de ALK1 en células endoteliales HMEC-1. **A)** Niveles de expresión de ENG y ALK1 observados por citometria de flujo en la superficie de células endoteliales HMEC-1. El gráfico muestra las veces de inducción de intensidad de fluorescencia. **B)** Los gráficos muestran las cantidades de transcritos de ARNm de ENG y ALK1 existentes en estas células medidos por PCR a tiempo real. La cantidad de ARNm de ENG aumenta con tratamiento de N-acetilcisteína mientras que en el caso de ALK1 disminuye.

A**B**

1.4.2 La señalización de la vía de NF- κ B disminuye tras tratamiento con N-acetilcisteína

Li y colaboradores ya mostraron que en células endoteliales tratadas con el mediador de inflamación TNF- α , la cantidad de ARN y proteína de ENG disminuía. El factor TNF- α al unirse a su receptor de la superficie celular, desencadena una ruta de señalización mediada por la activación de NF- κ B. Estas células tratadas con TNF- α experimentaban una disminución en los niveles de Endogлина en superficie. Si la expresión de Endogлина disminuye en condiciones de inflamación (Li y col., 2005), NAC, inhibidor de la activación de NF- κ B, podría revertir ese efecto.

Para estudiar estos sitios NF- κ B se realizaron transfecciones en células HMEC-1 con el vector reportero pKBF-luc, que contiene 3 sitios de unión para NF- κ B en tándem. Las células fueron tratadas con TNF- α (20 ng/ml), NAC (20 μM) o por ambos simultáneamente. La actividad luciferasa de este reportero aumentaba hasta 4,25 veces

al tratar con el factor inflamatorio TNF- α ya que éste al unirse a su receptor en la membrana celular desencadena la cascada de señalización que finaliza con la entrada de NF- κ B en el núcleo uniéndose a sus sitios específicos de los genes diana. Al recibir el tratamiento con NAC, estas células muestran menos actividad luciferasa del reportero ya que NAC como antioxidante, secuestra las especies reactivas de oxígeno que van a contribuir a la activación de NF- κ B como factor de transcripción. Se observa una bajada de hasta 0,25 veces en la actividad de este reportero. El tratamiento combinado de TNF- α y NAC, da lugar a unos niveles de inducción (1,4 veces) mucho más bajos que con tratamiento sólo de TNF- α (Figura 24). Al estar disminuida esta ruta, al tratar las células con NAC, no se activará la expresión de genes como ICAM, VCAM, PECAM, interleuquinas o citoquinas, responsables de la respuesta inflamatoria. Esta reducción en la respuesta inflamatoria podría ser la responsable del aumento de expresión de Endoglin.

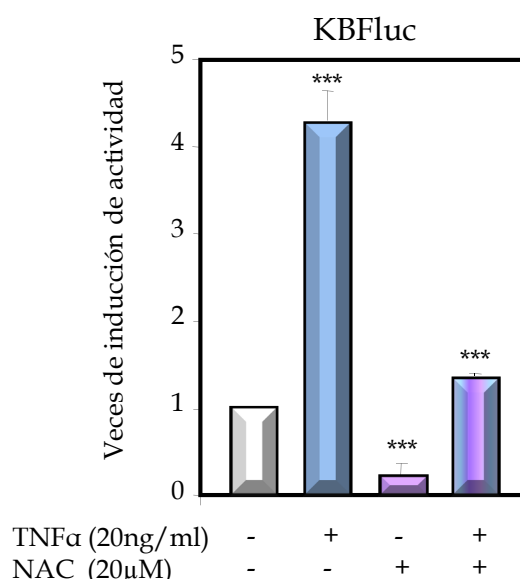


Figura 24. N-acetilcisteína anula la acción de TNF- α en células endoteliales HMEC-1. Estas células fueron transfectadas con el vector reportero pKBF que posee tres sitios de unión para el factor NF- κ B. Se observa como tratamientos con TNF- α aumentan la actividad de este reportero mientras que N-acetilcisteína lo está inhibiendo, debido a sus funciones como antioxidante, provocando la inactivación de NF- κ B. Tratamiento conjunto de TNF- α y N-acetilcisteína, disminuye en gran medida la activación por TNF- α .

1.4.3 N-acetilcisteína no promueve cambios en los ensayos de cierre de herida ni tubulogénesis.

Tras realizar la herida en la monocapa de HUVEC, las células se cultivaron en ausencia o presencia de distintas concentraciones de NAC (50 μ M y 100 μ M).

Observando las distintas fotografías tomadas no se aprecian diferencias en la velocidad de migración entre células tratadas y sin tratar, ya que a las 24h el cierre de la herida realizada es muy similar (Figura 25A). Como podemos ver en el gráfico la distancia migrada a los distintos tiempos es prácticamente la misma. En el ensayo de formación de tubos sobre matrigel, se observa que la red de tubos que se forma con o sin tratamiento de NAC es muy parecida. El número total de tubos completamente cerrados que forman esta red es muy similar en las distintas concentraciones, como podemos observar en las fotografías y en el gráfico (Figura 25B).

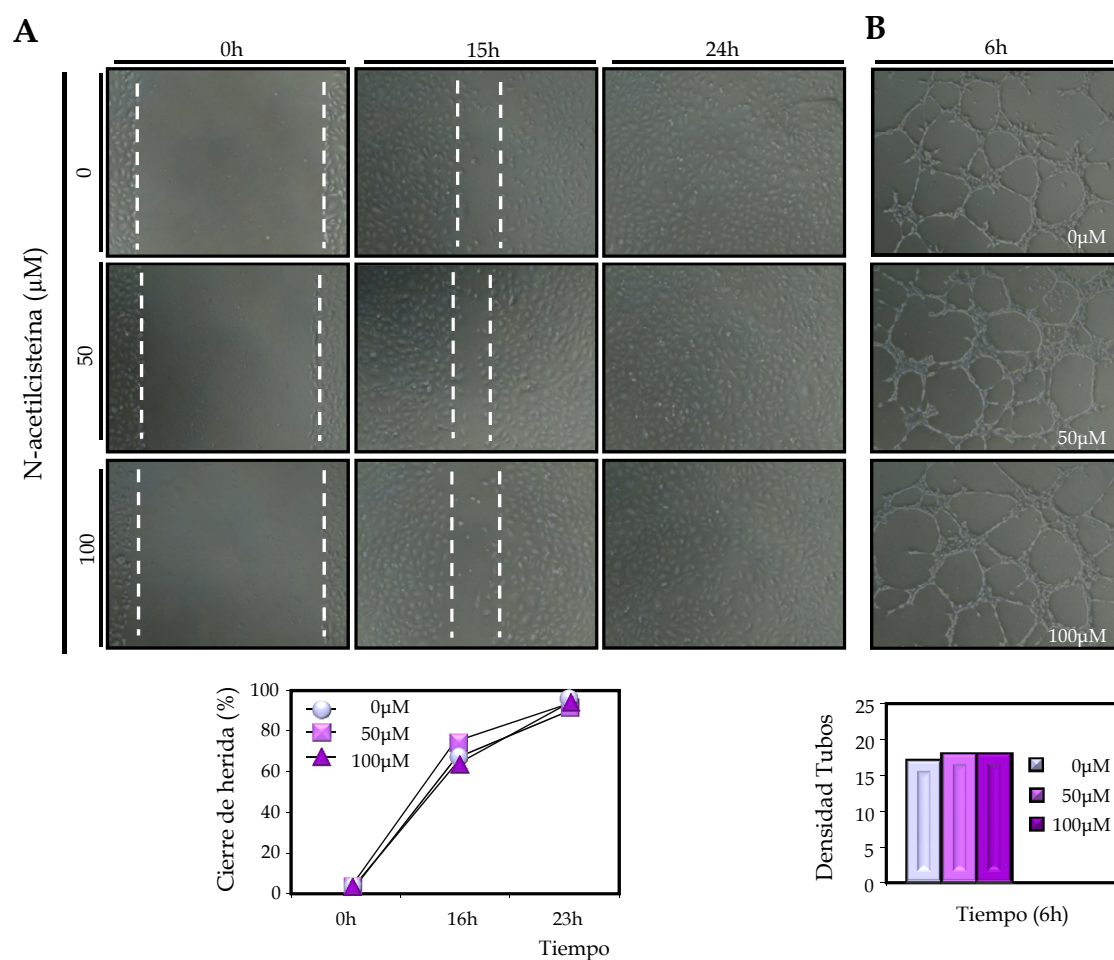


Figura 25. N-acetilcisteína no afecta a la migración ni a la formación de tubos en cultivos primarios HUVECs. A) La migración de células tratadas con N-acetilcisteína no se ve alterada si la comparamos con células control. **B)** El número de tubos completamente cerrados que se forman a las 6h de tratamiento es prácticamente el mismo.

2. Estrategia basada en la normalización de la vasculatura mediante fármacos antiangiogénicos

No sólo inhibiendo la fibrinólisis o compensando la haploinsuficiencia de Endoglin o ALK1, podemos reducir los sangrados y mejorar la vasculatura. Una estrategia alternativa se basaría en el uso de los fármacos antiangiogénicos, utilizados en episodios tumorales que hacen desaparecer la irrigación vascular del tumor, dando lugar así a la desaparición de éste. En nuestro caso buscamos un fármaco que pueda ser capaz de disminuir o anular la vasculatura anormal existente en la mucosa nasal de los pacientes, para dar lugar a una red vascular normalizada.

El ensayo funcional de angiogénesis/antiangiogénesis ha sido la formación de tubos sobre matrigel, completado con ensayos de migración para el cierre de la discontinuidad en monocapa (*Wound Healing*).

2.1 Genisteína

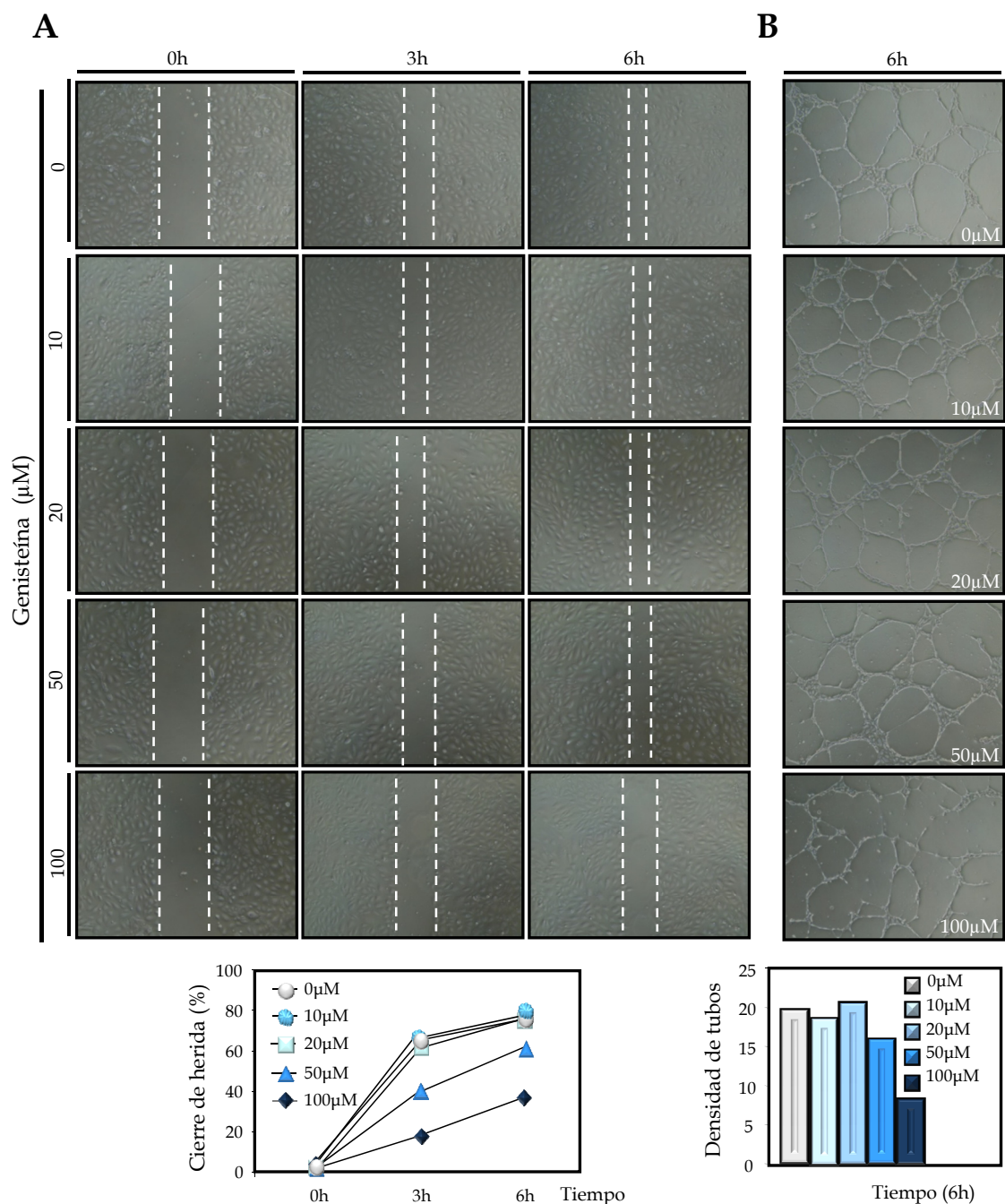
Actualmente ensayado en multitud de publicaciones como tratamiento antiangiogénico en distintos tipos de tumores, este fitoestrógeno ha sido utilizado en nuestro laboratorio para estudiar el comportamiento de las células endoteliales cultivadas en presencia del mismo.

2.1.1 La velocidad de migración y la formación de tubos disminuyen

En el ensayo de cierre de herida, se observan diferencias en la migración celular, cuando las células endoteliales habían recibido el tratamiento de las dosis más altas utilizadas de 50µM y 100µM. Las células tratadas con estas dosis experimentan un leve retraso en la migración y forman menos tubos completamente cerrados, siendo una red tubular más abierta si la comparamos con las células que no han recibido el tratamiento (Figura 26A,B).

(Página siguiente)

Figura 26. Efecto de la Genisteína en ensayos de angiogénesis *in vitro* en HUVECs. A) Ensayo de cierre de herida o *Wound Healing*. Tras 5h horas de la rotura de la monocapa endotelial, se observa que el cierre de la herida se produce más lentamente cuando las células reciben tratamiento de Genisteína 50µM y 100µM. Se semicuantificó la velocidad de cierre de la herida mediante la medición de la distancia migrada. **B) Ensayo de tubulogénesis.** La formación de la red tubular sobre matrigel, se ve disminuida sólo en tratamientos con 100µM, como muestran las imágenes y el histograma.



2.1.2 Los tratamientos con Genisteína aumentan los niveles de expresión de ENG y ALK1 en células HMEC-1

Se midió la expresión de Endoglina y ALK1 en HMEC-1 por citometría de flujo, encontrando diferencias significativas en los niveles de estas proteínas en superficie celular, solo en los tratamientos de 50μM y 100μM, alcanzando en el caso de ENG, 2 y 1,6 veces de inducción y en el caso de ALK1 2,4 y 2,2 veces de inducción (Figura 27). La

cantidad de ARNm, comparada entre distintos tratamientos no mostró diferencias significativas al comparar con las células que no habían recibido tratamiento (datos no mostrados).

Genisteína aumenta los niveles de ENG y ALK1 en superficie, pero sin embargo, el tratamiento con este fitoestrógeno ejerce un efecto antiangiogénico-antimigratorio a las dosis más altas, efecto que sería independiente de ENG y ALK1, ocasionado seguramente por la inhibición de VEGF (Yu y col., 2012).

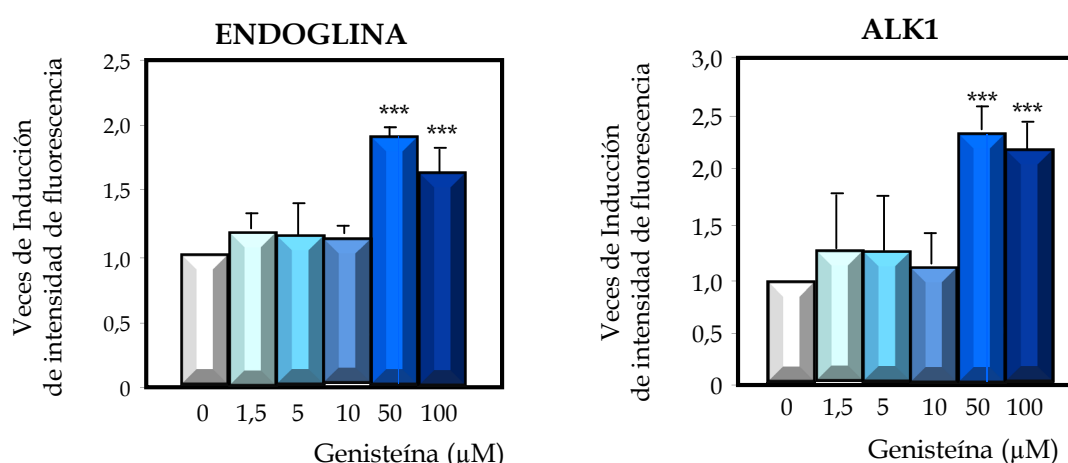


Figura 27. Genisteína aumenta los niveles de ENG y ALK1 en la membrana de células HMEC-1. Expresión de ENG y ALK1 medida por citometría de flujo tras tratamiento con Genisteína. Se muestra el gráfico que representa las intensidades medias de fluorescencia de ALK1 y ENG, observándose un aumento estadísticamente significativo de ambas proteínas, en las células que habían sido tratadas con las dosis más altas de 50μM y 100μM.

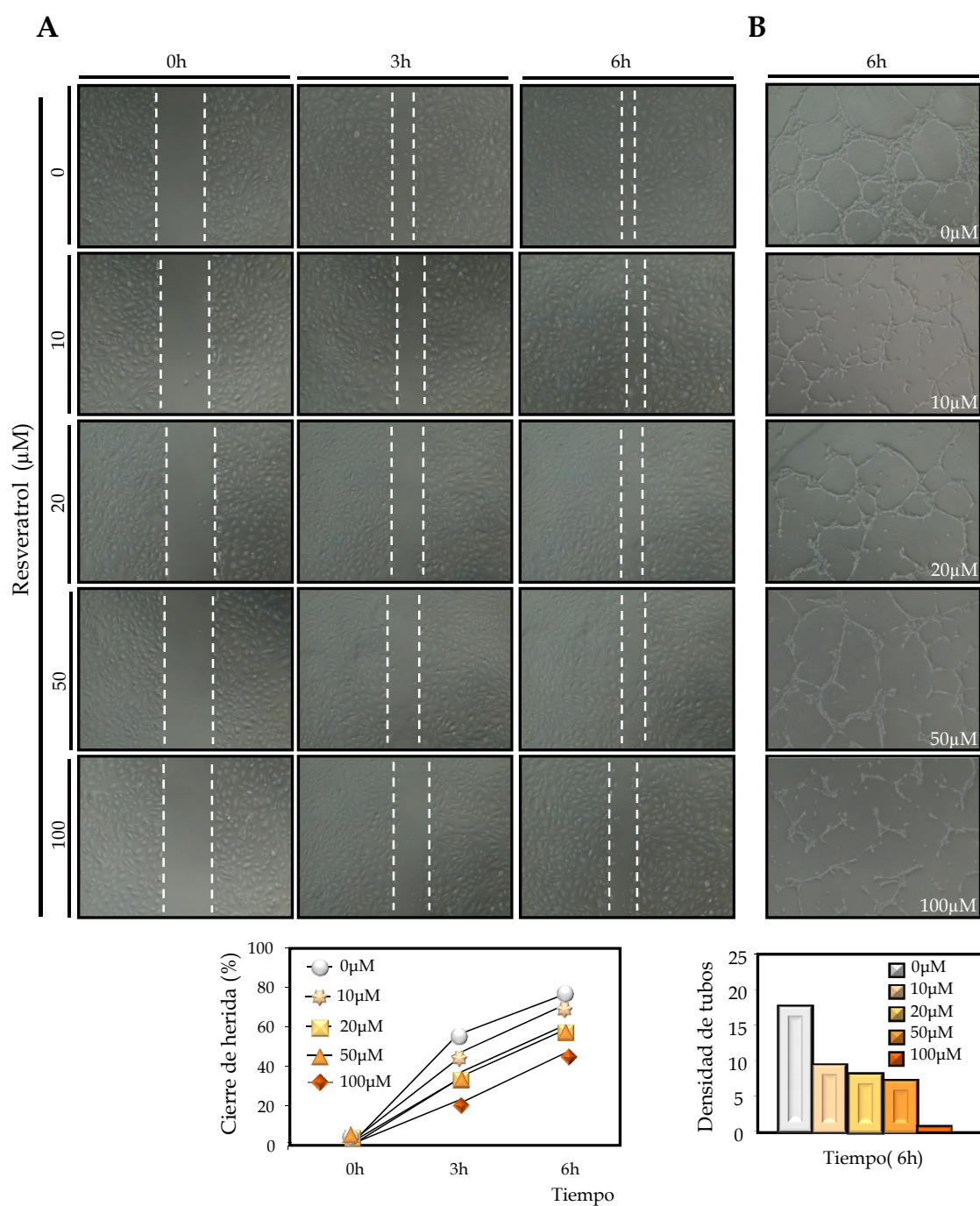
2.2 Resveratrol

Se realizaron ensayos con este otro fitoestrógeno de la familia de los cumestanos, conocido por su propiedad antiangiogénica (entre otras) en tratamientos de distintos tumores.

2.2.1 Disminución de la migración celular y la tubulogénesis

Los ensayos funcionales de angiogénesis *in vitro* realizados mostraron un claro comportamiento antiangiogénico del Resveratrol. En el rango de 0-5μM no se encuentran diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo dosis de Resveratrol mayores de 10μM, producen una inhibición en la formación de los tubos, que empiezan a encontrarse abiertos, a diferencia de lo que ocurre en dosis inferiores a

5 μ M (Figura 28A,B). Esta inhibición se acentúa en tratamientos de 100 μ M dónde prácticamente no existen tubos cerrados en la red, sólo alguna que otra conexión entre células. En cuanto a la velocidad de migración en los ensayos de cierre de herida observamos como células endoteliales tratadas con Resveratrol, muestran una migración retrasada en comparación con las células que no han sido tratadas. Este comportamiento se comienza a observar al igual que en el caso de la tubulogénesis desde la dosis de 10 μ M en adelante.



(Página anterior)

Figura 28. Efecto del Resveratrol en ensayos de angiogénesis *in vitro* en HUVECs. B) Ensayo de reparación de herida. Existe una disminución en la distancia migrada por las células para cerrar la herida si comparamos células tratadas con Resveratrol, con las células que no han recibido tratamiento. **C) Ensayo de tubulogénesis.** La formación de tubos se inhibe parcialmente a partir de la dosis de 10 μ M, produciéndose una inhibición total de la formación tubular a la concentración de 100 μ M, como observamos en las imágenes y en el histograma.

2.2.2 Aumento en los niveles de ALK1 en la superficie de células HMEC-1

Tras los ensayos de citometría de flujo realizados, se puede observar que no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos en los niveles de expresión de Endoglina, pero sí al medir ALK1, que a la dosis más alta de 100 μ M se aprecia un aumento de 1,6 veces de inducción (Figura 29)

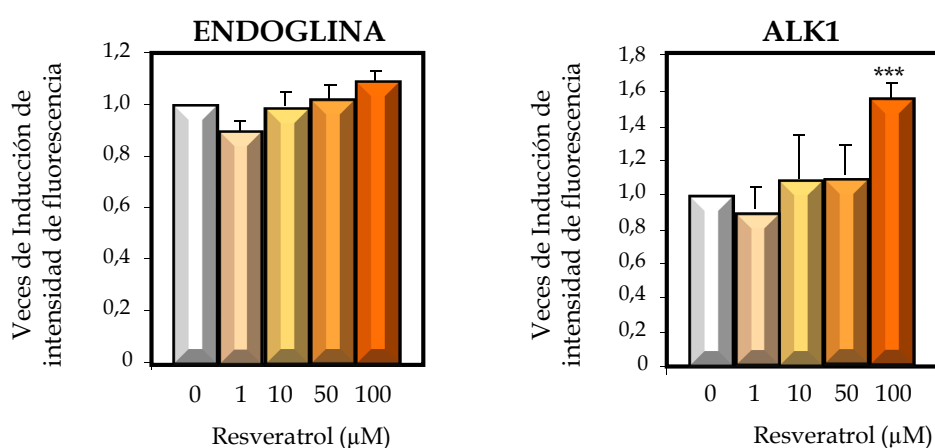


Figura 29. Resveratrol provoca un leve aumento en los niveles de ALK1 en HMEC-1. A) La cantidad de ENG y ALK1 se midió mediante citometría de flujo, observando que no se encuentran diferencias significativas en los niveles de ENG y que sólo aparecen diferencias significativas en los niveles de ALK1 en células tratadas con 100 μ M.

2.3 Propranolol

El β -bloqueante Propranolol fue creado para indicaciones cardiológicas como la angina de pecho, arritmias cardíacas, hipertensión o migrañas entre otras. Actualmente su uso más novedoso es en HI (Hemangiomas Infantiles), tumores benignos de la vasculatura. Con el objetivo de estudiar sus efectos en células endoteliales hemos obtenido los siguientes resultados.

2.3.1 Disminución de la migración celular y la tubulogénesis

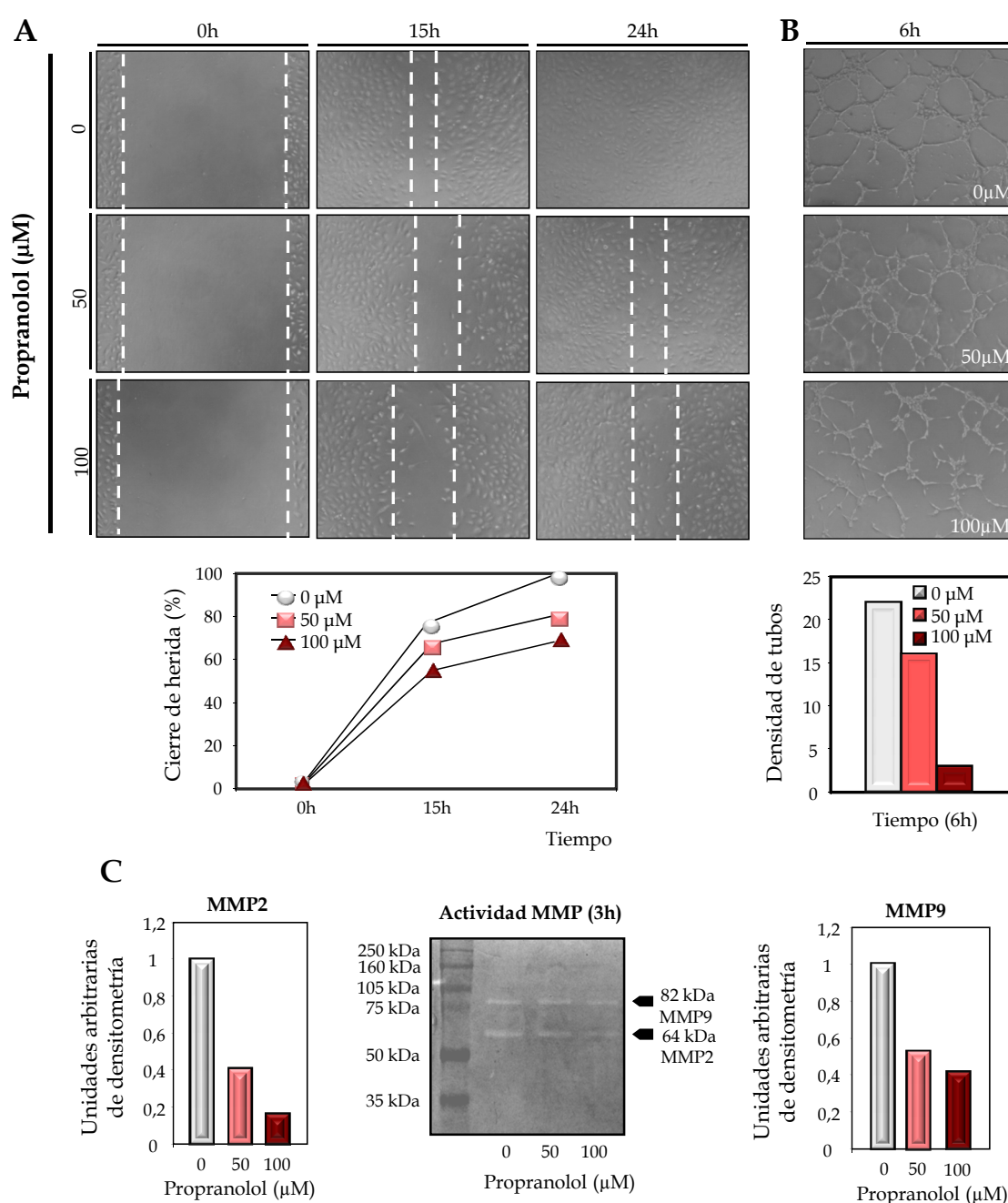
Diferentes dosis de Propranolol fueron utilizadas en el estudio de los ensayos funcionales de reparación de herida y angiogénesis realizados en células endoteliales HUVEC. Tras practicar heridas en las monocapas endoteliales, las células que no habían sido tratadas mostraban una migración mayor que las tratadas con Propranolol, en las cuáles se observa que este betabloqueante retrasa la movilidad celular. Estos efectos son mayores a la máxima concentración utilizada de 100 μ M, a la cual, tras 24h de realizar la herida, ésta permanecía abierta mientras que las células sin tratar habían conseguido cerrar la discontinuidad existente.

En el ensayo de formación de tubos sobre matrigel se utilizaron las mismas concentraciones de Propranolol y se observa cómo la red de tubos creada por células tratadas con 50 μ M está formada por menos tubos que la red creada por células sin tratamiento. Cuando la dosis empleada es de 100 μ M, el efecto es claramente inhibitorio y antiangiogénico, ya que prácticamente no existe formación de red vascular (Figura 30 A, B).

La migración celular es un complejo proceso que requiere coordinación entre las células adyacentes, y una buena regulación entre la célula y la matriz y su posterior remodelación. La actividad de las metaloproteasas (MMPs) es esencial en este proceso ya que estas modulan las uniones intercelulares y de las células a la matriz. Estas enzimas, cuya familia está formada por 20 miembros, cortan proteolíticamente distintos componentes de la matriz extracelular y se relacionan no solo con procesos normales de la célula (migración, apoptosis, comunicación celular) sino también con condiciones patológicas como procesos tumorales (Gialeli y col., 2010). Las MMPs están por tanto involucradas en la degradación de la matriz extracelular y en la remodelación vascular (McCawley y Matrisian, 2001). Una vez estudiados los efectos inhibitorios de este fármaco sobre la formación de tubos y la migración, decidimos investigar si la razón de la disminución en esta movilidad celular era debida a la implicación de estas MMPs. La zimografía realizada con sobrenadantes de HMEC-1 con y sin tratamiento de Propranolol mostró actividad de dos metaloproteasas, en los tamaños de 64 y 82 kDa, correspondiendo estos pesos moleculares a MMP2 y MMP9, respectivamente (Perez, 2004). Con las dosis ensayadas de Propranolol, 50 μ M y 100 μ M, la actividad de la MMP2 disminuía un 60% y un 80%, respectivamente. De forma similar, MMP9 mostraba una disminución de un 50% y un 60% para las mismas dosis,

si las comparamos con la actividad en las células sin tratar (Figura 30C). Propranolol parece estar inhibiendo la actividad de las MMP2 y MMP9 en células endoteliales HMEC-1, pudiendo contribuir a la disminución en la migración celular necesaria en los ensayos de cierre de herida o en la formación de tubos.

Annabi y colaboradores ya observaron una reducción en la migración de células endoteliales de cerebro (HBECs) tratadas con Propranolol debido a una disminución en los niveles de la proteína HuR, estabilizadora de ARN mensajeros entre los que se encuentra el de la MMP9, que sería similar a los resultados obtenidos en HMEC-1 (Annabi y col., 2009).



(Página anterior)

Figura 30. Propranolol actúa como una droga antiangiogénica en células endoteliales HMEC-1 inhibiendo la migración y la formación de tubos y disminuyendo la actividad de MMP2 y 9. A) Ensayo de cierre de herida. Se observa que tras 20-24h las células que no han recibido tratamiento han cerrado la herida, mientras que las células tratadas con Propranolol necesitan hasta 30h para cerrarla. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la distancia migrada. B) Ensayo de formación de tubos. Las imágenes tomadas tras 6h de tratamiento con Propranolol sobre matrigel muestran cómo células tratadas con 50µM forman una red tubular menos densa que las células control, y que esta red es completamente inhibida a 100µM. El gráfico inferior muestra el número de tubos cerrados por condición. C) En los gráficos obtenidos tras la densitometría de las bandas del ensayo de la zimografía, observamos que en los sobrenadantes de HMEC-1 aparece actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9, que va disminuyendo al ir aumentando la dosis de Propranolol.

2.3.2 La expresión de las proteínas angiogénicas Endoglina y ALK1 y sus ARNm disminuyen en células HMEC-1

Uno de los mecanismos por los que el Propranolol actúa anulando la angiogénesis en HI es la inhibición del factor angiogénico VEGF (Storch y Hoeger, 2010), ya que en estos tumores existe una desregulación en esta ruta, habiendo una mayor activación de este factor. Endoglina y ALK1 también desempeñan un papel crucial en la angiogénesis al igual que VEGF, ya que promueven la migración y la proliferación de las células endoteliales y también pueden inhibir la diferenciación y activar la actividad de las MMPs para degradar la matriz extracelular y así dar lugar a nuevas ramificaciones de vasos. Ya que además son los genes mutados en HHT (Goumans y col., 2002), hemos estudiado si los efectos anti-migratorios y anti-angiogénicos observados tras tratamiento con Propranolol, podían ser debidos, aparte de a la baja actividad de las MMP2 y MMP9, a una alteración en los niveles de las proteínas Endoglina y ALK1.

Los niveles de ambas proteínas en células HMEC-1 tratadas y sin tratar durante 24h con Propranolol se midieron por citometría de flujo, observando una disminución de hasta 0,2 y 0,3 veces para las concentraciones de 50µM y 100µM, respectivamente (Figura 31A).

Dado que el Propranolol está disminuyendo la cantidad de ambas proteínas en la membrana de las células endoteliales HMEC-1, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real, que reveló que existía una disminución en los niveles de ambos ARN mensajeros, hasta 0,73, 0,67 y 0,43 veces en el caso de Endoglina y de 0,65,

0,5 y 0,42 veces en el caso de ALK1, en células tratadas con 20 μ M, 50 μ M y 100 μ M, respectivamente (Figura 31B).

Ya que el Propranolol disminuye los niveles de los ARN mensajeros de Endoglin y ALK1, el siguiente paso fue estudiar si estos efectos eran debidos a una disminución en la actividad del promotor de estos genes. Para ello, las células HMEC-1 se transfectaron con reporteros que contienen secuencias de ambos promotores y fueron cultivadas en ausencia o presencia de Propranolol. La actividad del promotor de Endoglin se encuentra disminuida 0,2 veces en la máxima dosis ensayada mientras que en el caso de ALK1 esta actividad baja 0,3 veces desde la dosis mínima de 20 μ M (Figura 31C).

Los resultados, sugieren que el Propranolol está inhibiendo la actividad transcripcional de Endoglin y ALK1 dando lugar a niveles más bajos de ARN mensajero y proteínas. Tanto Endoglin como ALK1 promueven migración, proliferación y angiogénesis mediante la ruta de señalización de TGF- β /ALK1/Smad 1/5/8, por lo que las propiedades anti-angiogénicas del Propranolol mostradas en la Figura 30 podrían deberse, en parte a esta disminución en los niveles de expresión de ambas proteínas.

Ya que Endoglin y ALK1 son receptores de miembros de la superfamilia del TGF- β , el siguiente paso a estudiar fue si estaba afectada la ruta de señalización de TGF- β . Para elucidar esta cuestión, fueron transfectados los reporteros específicos BRE-luc y CAGA-luc, que contienen promotores artificiales con repeticiones de secuencias consenso de unión de factores Smad, BRE-luc contiene dos sitios BRE (*BMP Responsive Element*; GTCT) dónde se va a unir Smad 1/5/8 (TGF- β /ALK1) y CAGA-luc contiene doce sitios CAGA para la unión de Smad2/3 (TGF- β /ALK5), ambos acoplados al gen de la luciferasa. Tras tratamiento con Propranolol observamos que la actividad de BRE-luc disminuye a 0,9, 0,8 y 0,35 veces, al ir aumentando la dosis del fármaco de 20 μ M, 50 μ M y 100 μ M, comparando con los resultados de células sin tratar, mientras CAGA-luc disminuía a 0,6 sin haber diferencias entre dosis (Figura 31D).

Tras estos primeros resultados en la disminución de la expresión de los factores proangiogénicos Endoglin y ALK1 tras tratamiento con Propranolol, se puede sugerir que los efectos anti-migratorios y anti-angiogénicos que hemos encontrado en células endoteliales, podrían deberse a la disminución de estas proteínas, además de los efectos ya publicados en relación a la inhibición de la señalización de VEGF.

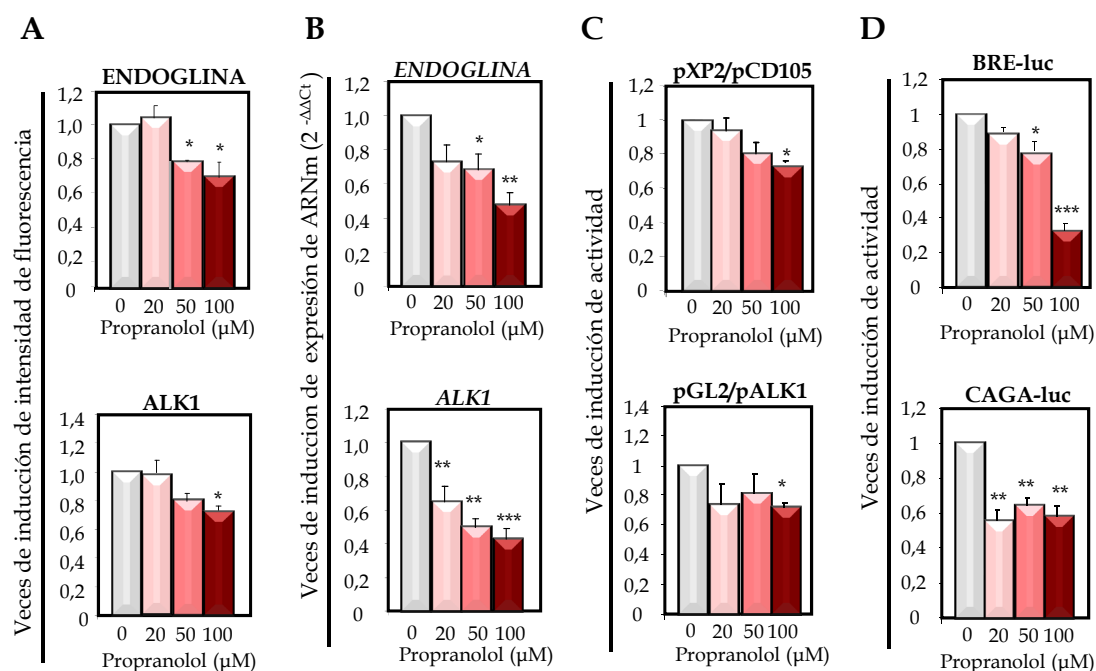


Figura 31. Propranolol disminuye la expresión de Endoglin y ALK1 en células endoteliales HMEC-1. A) Expresión de ENG y ALK1 medida por citometría de flujo tras tratamiento con Propranolol. El gráfico representa las intensidades medias de fluorescencia de ALK1 y ENG. B) Ensayo de PCR en tiempo real de ARN de células tratadas y sin tratar con Propranolol. Los niveles de ARNm disminuían significativamente en ambos casos, sobre todo en las dosis más altas de 50μM y 100μM. C) Se muestra la actividad transcripcional de las construcciones pGL2/pALK1 y pXP2/pCD105, que experimentan una reducción significativa en su actividad solo en tratamientos de 100μM de Propranolol. D) **Propranolol disminuye la actividad de los reporteros específicos de la ruta de TGF-β1.** BRE-luc contiene sitios de unión para pSmad1/5/8 (TGF-β1/ALK1) y CAGA-luc contiene sitios de unión para pSmad2/3 (TGF-β1/ALK5). Mientras que BRE-luc muestra una disminución estable desde la dosis de 20μM a la de 100μM, la actividad en BRE-luc empieza a disminuir significativamente a partir de tratamientos con 50μM.

2.3.3 Propranolol disminuye la expresión de PAI-1, promoviendo el proceso de la fibrinólisis en HMEC-1

Propranolol fue descrito como profibrinolítico tras las observaciones del aumento de la cantidad de ARN mensajero del activador de plasminógeno uPA en células endoteliales de cerebro (HBMEC) (Perachia y col., 1989). Ya que las telangiectasias existentes en los pacientes HHT tienen actividad profibrinolítica (Kwaan y Silverman, 1973; Sabba y col., 2001), decidimos estudiar estas propiedades del Propranolol en la fibrinólisis de las células endoteliales HMEC-1. Se han realizado ensayos de RT-PCR cuantitativa y no se han encontrado diferencias entre los niveles de ARN mensajero de

uPA en células tratadas y sin tratar y al igual ocurría en los ensayos de luciferasa con el vector reportero que contiene el promotor de uPA (Figura 32A). Los niveles de uPA no están afectados pero al estudiar los de su inhibidor; PAI-1, observamos que tanto la cantidad de ARNm como la actividad del promotor se encuentran disminuidas. En cuanto al ARNm se observa una disminución a 0,5 y 0,3 veces con respecto al control, cuando las células se tratan con dosis de 50 μ M y 100 μ M de Propranolol y al medir la actividad del promotor, ésta disminuye hasta 0,65, 0,60 y 0,30 veces con concentraciones de 20 μ M, 50 μ M y 100 μ M (Figura 32B), en los ensayos de transfección. El Propranolol en células HMEC-1 no está aumentando la expresión de uPA, sino que al disminuir la de su inhibidor PAI-1, existirá mayor cantidad de uPA activo en la célula, por lo que se favorecerá la activación del plasminógeno.

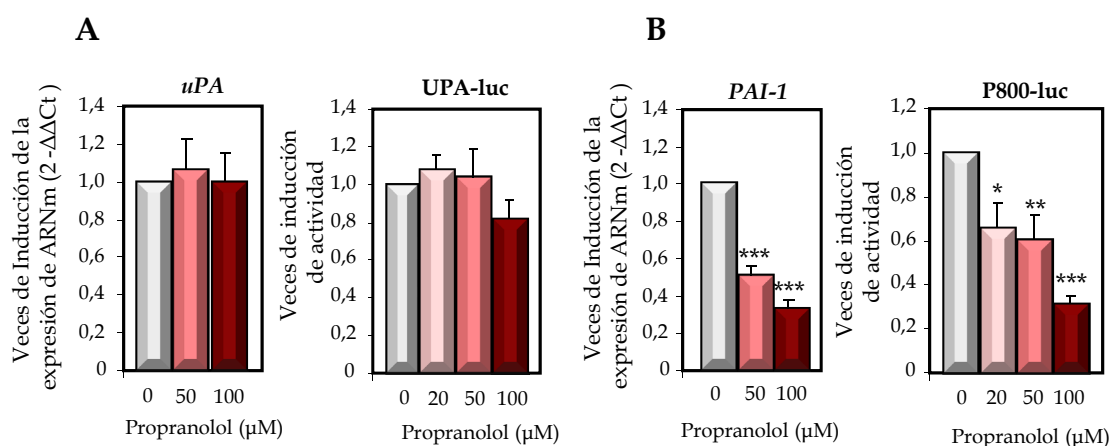


Figure 32. Propranolol actúa como profibrinolítico disminuyendo los niveles de la proteína inhibidora del activador de plasminógeno, PAI-1, sin afectar a los niveles del activador de plasminógeno uPA en células endoteliales HMEC-1. A) Los niveles del ARNm de uPA se midieron tras 6 horas de tratamiento por PCR a tiempo real, no observándose diferencias entre los distintos tratamientos. Los mismos resultados fueron obtenidos al estudiar la activación del reportero uPA-luc que contiene parte de la secuencia del promotor de este gen. B) Tratamiento con Propranolol disminuye los niveles de ARNm de PAI-1, al igual que ocurre al medir la actividad del vector reportero p800-luc que contiene parte del promotor de PAI-1. La expresión de PAI-1 está disminuida a ambos niveles, por lo que al haber menos cantidad de inhibidor, existe más actividad de uPA en estas células.

2.3.4 Tratamientos largos con Propranolol desencadenan el proceso de apoptosis en células HMEC-1

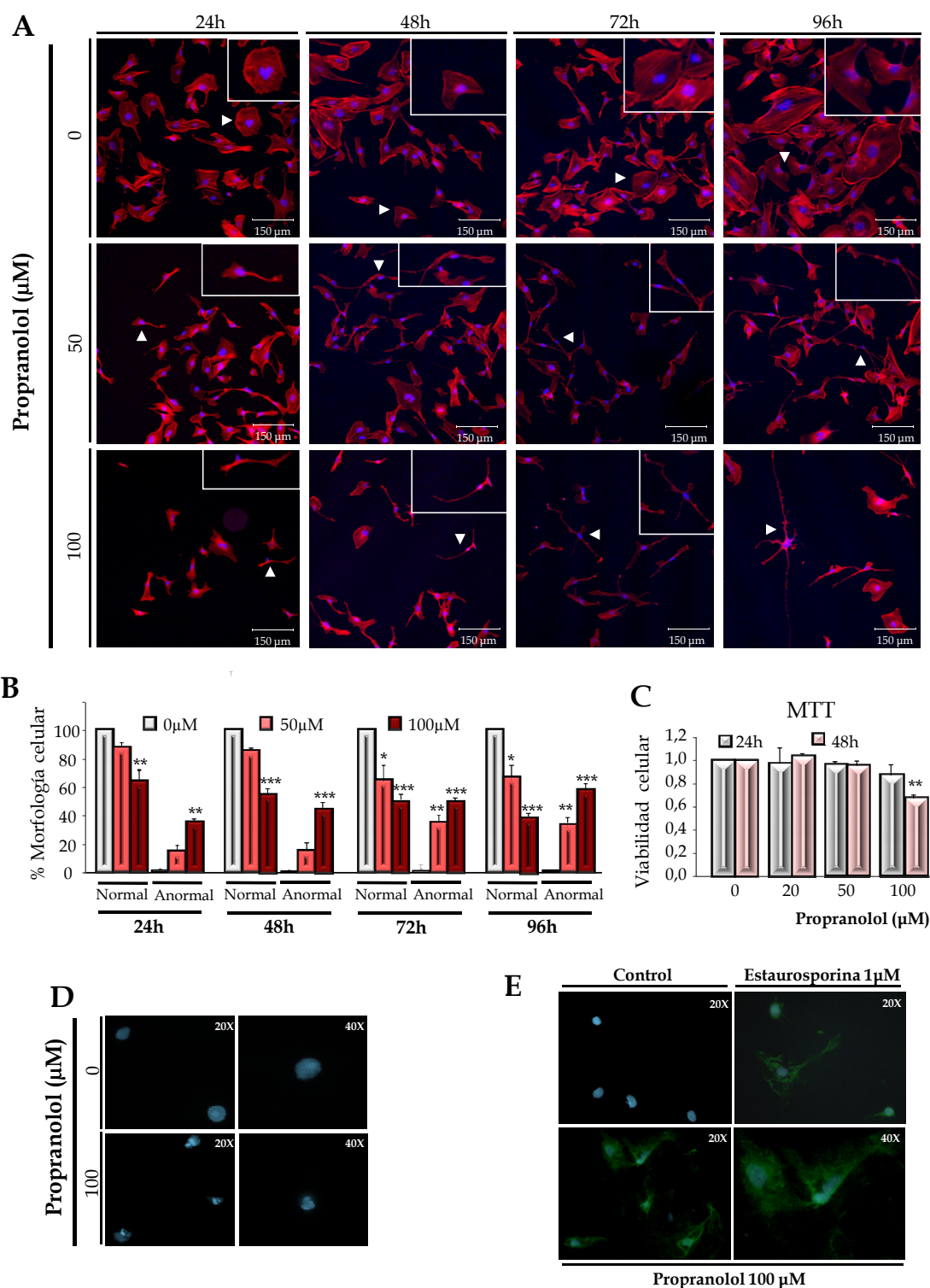
Ya que Propranolol se ha convertido en los últimos años en una herramienta terapéutica muy útil para el tratamiento de los HI, se decidió estudiar uno de los mecanismos por el que estos tumores desaparecen. La apoptosis o muerte celular programada se caracteriza por la fragmentación de la cromatina, burbujeo del

citoplasma, pérdida de la membrana y activación de distintas rutas de señalización. Para estudiar este proceso las células HMEC-1 se han tratado a diferentes dosis de Propranolol (20-100 μ M) y a distintos tiempos. Se ha visualizado la morfología de estas células por microscopía de fluorescencia mediante la tinción de citoesqueleto de actina y se observa cómo células sin tratar muestran una morfología redondeada y expandida que se encoge y alarga cuando estas células reciben tratamiento.

Estos cambios en la morfología celular son más marcados al ir aumentando el tiempo y la dosis de tratamiento ya que como podemos observar, a las 96 horas con 100 μ M de tratamiento prácticamente no hay células adheridas al cristal. Las flechas blancas muestran la morfología mayoritaria en ese campo, pudiéndose observar en el gráfico como la proporción de la morfología redondeada/normal va disminuyendo tras recibir tratamiento de Propranolol mientras que la anormal/elongada va aumentando (Figura 33A, B). En concordancia con los datos del ensayo de proliferación celular MTT, dónde la viabilidad de las células HMEC-1 tras 48h a 100 μ M se ve afectada (Figura 33C). La morfología nuclear de las células que se desprenden del cristal sin haber sido tratadas es redondeada mientras que con tratamientos de 100 μ M los núcleos tienen una forma irregular con zonas de cromatina condensada, característica de células en apoptosis (Figura 33D). En la figura 33E, se observa como Propranolol induce la traslocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular (ubicación normal) a la cara externa, siendo esta acción uno de los desencadenantes de la apoptosis. La tinción con Anexina V-FITC aparece en las células tratadas con Propranolol y Estaurosporina (control positivo) pero no en las células sin tratar. Podemos concluir que las células HMEC-1 bajo tratamiento de Propranolol, mueren mostrando características apoptóticas.

(Página siguiente)

Figura 33. Propranolol promueve apoptosis en células endoteliales HMEC-1. A,B) Las células recibieron tratamientos de 0-100 μ M durante 24-96h y se estudió la morfología celular mediante el citoesqueleto de actina (fluorescencia roja) en ensayos de inmunofluorescencia. C) **Propranolol promueve condensación de cromatina, apoyando la inducción de apoptosis.** Se realizaron tinciones nucleares de las células despegadas de la placa, observándose que, mientras los núcleos de células control mostraban una morfología circular, la de las células tratadas, era irregular y deforme. D) **Ensayos de proliferación celular con MTT.** Tratamientos de 100 μ M Propranolol durante 48h provocan una disminución en la supervivencia de hasta un 30%. E) Propranolol induce la traslocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, mientras en células control no se observa tinción con AnexinaV-FITC.



2.3.5 Las células EOMA son más sensibles al tratamiento con Propranolol que células HMEC-1/HUVEC

Dado que Propranolol se usa en el tratamiento de los HI, se decidió estudiar su efecto en ensayos funcionales en células EOMA que tienen su origen en un hemangioendotelioma de ratón, para observar si actúa de la misma manera. Los

resultados obtenidos son similares pero con diferencias mayores entre células tratadas y sin tratar, ya que a las dosis máximas de $100\mu\text{M}$, las células prácticamente no migran, ni mantienen conexiones entre ellas para formar la red de tubos (Figura 34A, B). Las células EOMA son células muy proliferativas, dónde el efecto anti-angiogénico y anti-migratorio del Propranolol es obvio tras el tratamiento de estas células. También se ha estudiado el efecto del Propranolol sobre apoptosis, al igual que con HMEC-1, ensayando las mismas dosis $50\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$. En este caso también se observan diferencias en el citoesqueleto de actina, entre células tratadas y sin tratar. Las células tratadas muestran un citoplasma más reducido y alargado, con prolongaciones cada vez más finas y elongadas, en comparación con las células control. La duración de los tratamientos fue menor ya que estas células son más sensibles al tratamiento que las HMEC-1 a tiempos más cortos.

En los tratamientos con la dosis máxima de $100\mu\text{M}$ y 48 horas, las células muestran una morfología muy reducida, perdiendo totalmente las prolongaciones para establecer conexiones entre ellas y prácticamente desprendiéndose casi todas del cristal. Las flechas blancas muestran la morfología que mas aparece en ese tipo de tratamiento, pudiéndose observar en el gráfico como la proporción de la morfología normal va disminuyendo tras recibir tratamiento de Propranolol mientras que la anormal va aumentando (Figura 35A,B). Se puede observar que en células EOMA, mientras los núcleos de las células control aparecen en una forma redondeada, los núcleos de las células tratadas muestran una morfología muy irregular con puntos de condensación de cromatina (Figura 35C). Los resultados obtenidos de este ensayo son similares a los obtenidos en células HMEC-1 tras tratamiento con Propranolol pero con mayores diferencias. En las células EOMA no sólo observamos diferencias en la morfología sino que los núcleos de las células tratadas aparecen fragmentados. La traslocación de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular (ubicación normal) a la cara externa, se observa como resultado del tratamiento de Propranolol. La tinción con Anexina V-FITC aparece en las células tratadas con Propranolol o Estaurosporina (control positivo) pero no en las células sin tratar (Figura 35D). En el gráfico del ensayo de proliferación celular MTT, observamos que la viabilidad de las células EOMA se ve afectada mucho antes que en las células HMEC-1 y a menor concentración (Figura 35E). Para averiguar si la apoptosis es la causa de la muerte celular tras el tratamiento con Propranolol, se estudió la expresión de un marcador de apoptosis como es la Caspasa-3, responsable del corte proteolítico y activación de

enzimas implicadas en el proceso de muerte celular. La Caspasa-3 se sintetiza en su forma inactiva Procaspasa-3 de 32 kDa y se activa tras un corte en dos sitios distintos originándose dos subunidades, una de 12kDa y otra de 17kDa. En los resultados obtenidos en el *western blot* realizado con los lisados de células EOMA tratadas y sin tratar con Propranolol, se puede observar que la expresión de Procaspasa-3 va disminuyendo al ir aumentando el tratamiento de Propranolol, mientras que la expresión de Caspasa-3 aumenta tras el tratamiento, promoviendo la cascada de apoptosis (Figura 35F). Podemos concluir que las células EOMA bajo tratamiento de Propranolol, terminan muriendo mostrando características apoptóticas, y probablemente de este modo actuaría el Propranolol, inhibiendo así el crecimiento de los HI.

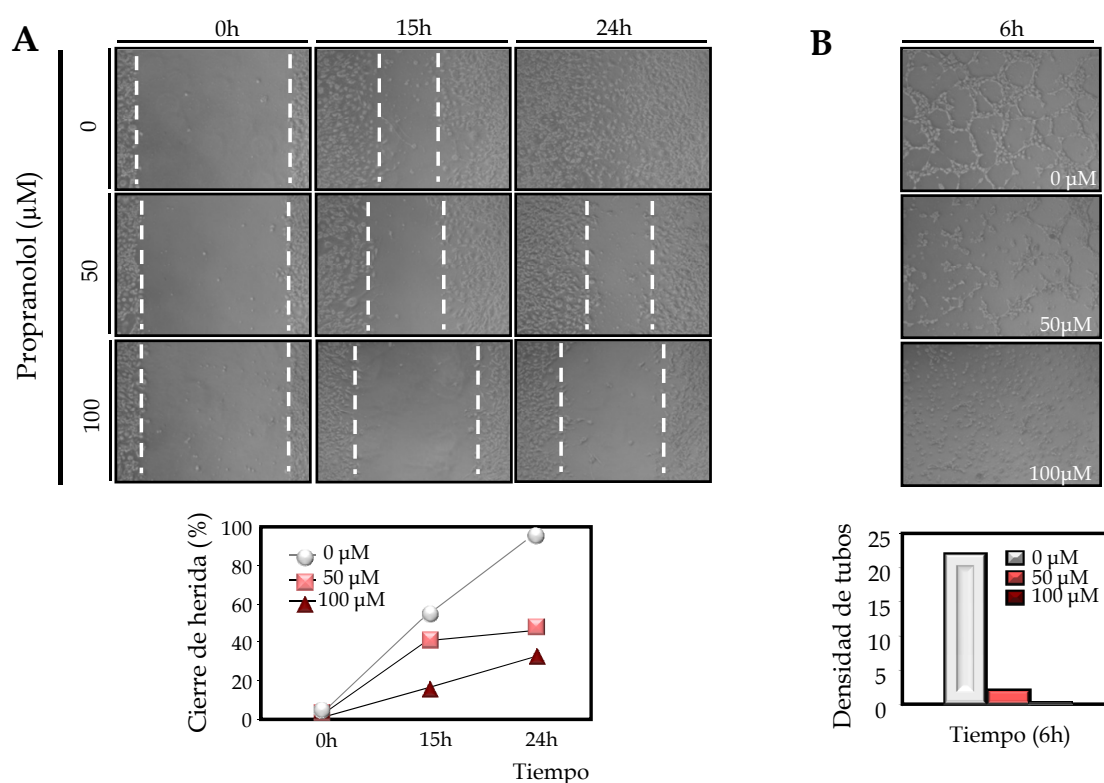


Figura 34. Propranolol inhibe la migración y formación de tubos en las células de hemangioendotelioma de ratón EOMA. A) En el ensayo de cierre de herida se observa una disminución en la velocidad con la que las células migran para invadir el espacio existente si comparamos con las células control. En la parte de abajo se muestra el gráfico de la distancia migrada. B) La formación de tubos se ve inhibida con tratamientos de Propranolol durante 6h, sobre todo en la dosis más alta utilizada de 100 μ M. En el gráfico inferior observamos el número de tubos formados.

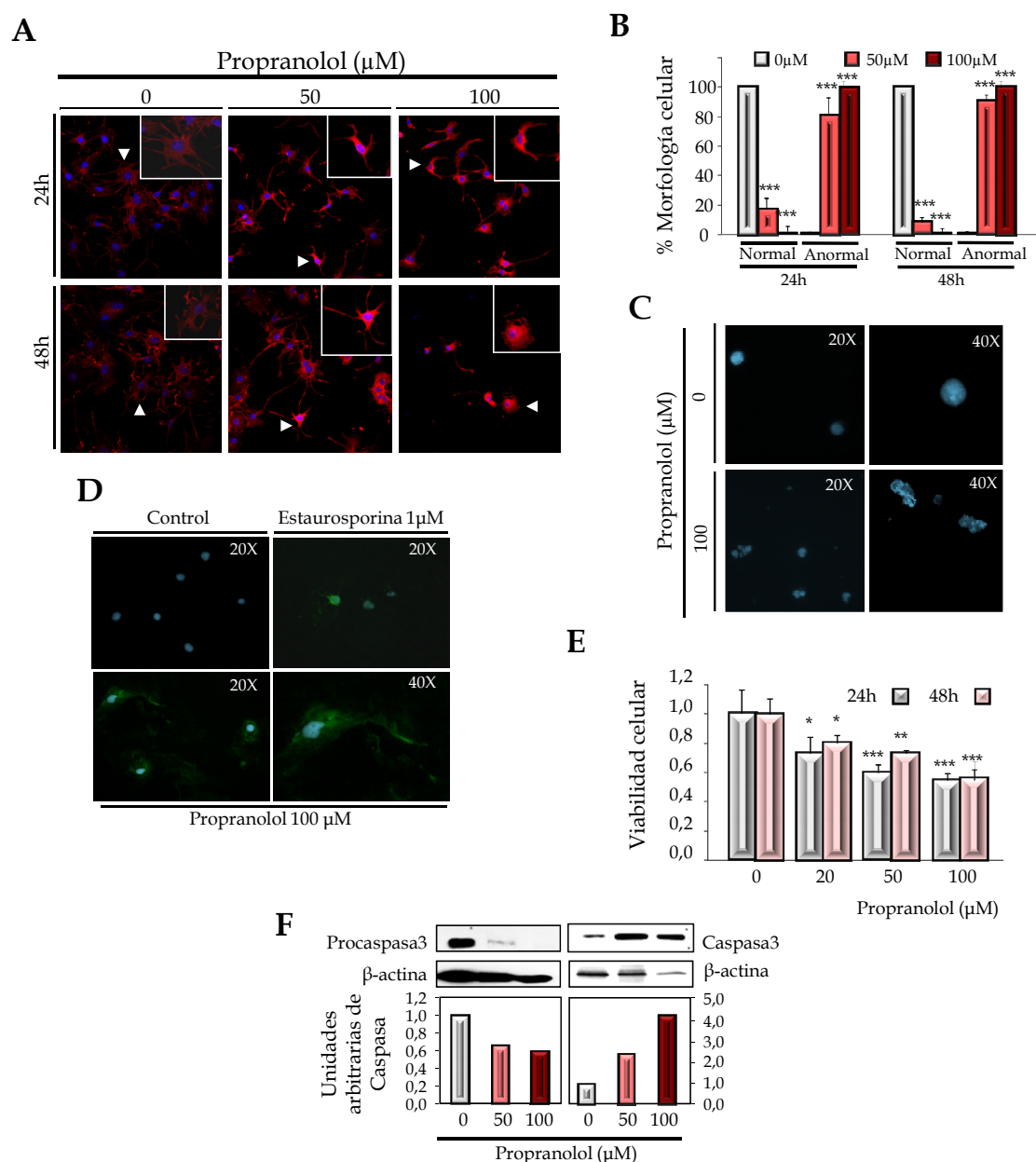


Figura 35. Propranolol promueve apoptosis en células endoteliales EOMA. A,B) Mediante la tinción del citoesqueleto de actina en ensayos de inmunofluorescencia se estudió la morfología celular (fluorescencia roja). Tras tratamiento de hasta 48h y 100 μM , la morfología celular varía, mostrándose las proporciones en el gráfico. Mientras que las células control poseen un cuerpo redondeado con bastantes prolongaciones, tras tratamiento con Propranolol el volumen celular se reduce al igual que el número de extensiones por célula. Las células van desapareciendo del cristal porque van muriendo y desprendiéndose. C) Propranolol promueve la condensación de cromatina. La tinción de núcleos de las células despegadas del cristal nos deja diferenciar entre los núcleos redondeados de las células control y los núcleos con morfología irregular de las células tratadas con Propranolol. D) Propranolol induce la traslocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, mientras en células control no se observa tinción con AnexinaV-FITC. E) **Ensayos de proliferación celular con MTT.** Tratamientos de 100 μM durante 48h provocan una disminución en la supervivencia de hasta un 40%. F) **Propranolol aumenta la activación de Caspasa-3.** Lisados celulares de EOMA se utilizaron en un ensayo de western blot, y como muestra la densitometría de bandas respecto a β -actina la expresión de Procaspasa-3 disminuye mientras que la de Caspasa-3 activa aumenta con la dosis de tratamiento de Propranolol, implicada en la ruta de apoptosis.

2.3.6 HUVECs procedentes de cordón umbilical HHT muestran una migración y formación de tubos menor con tratamiento de Propranolol, que HUVECs sanas

Los resultados de los ensayos mostrados hasta el momento, se han realizado en células HUVECs sanas, HMEC-1 o EOMA, por lo que disponiendo de HUVECs de un recién nacido HHT2 se decidió realizar ensayos funcionales para estudiar cómo respondían estas células a tratamientos con Propranolol. Se puede observar que si comparamos las células HHT con las sanas, tras el tratamiento con Propranolol, migran más lento y forman menos tubos. En general, las células HHT migran menos y forman menos cantidad de tubos que las células HUVEC procedentes de donante sano como se muestra en la Figuras 36 y 37.

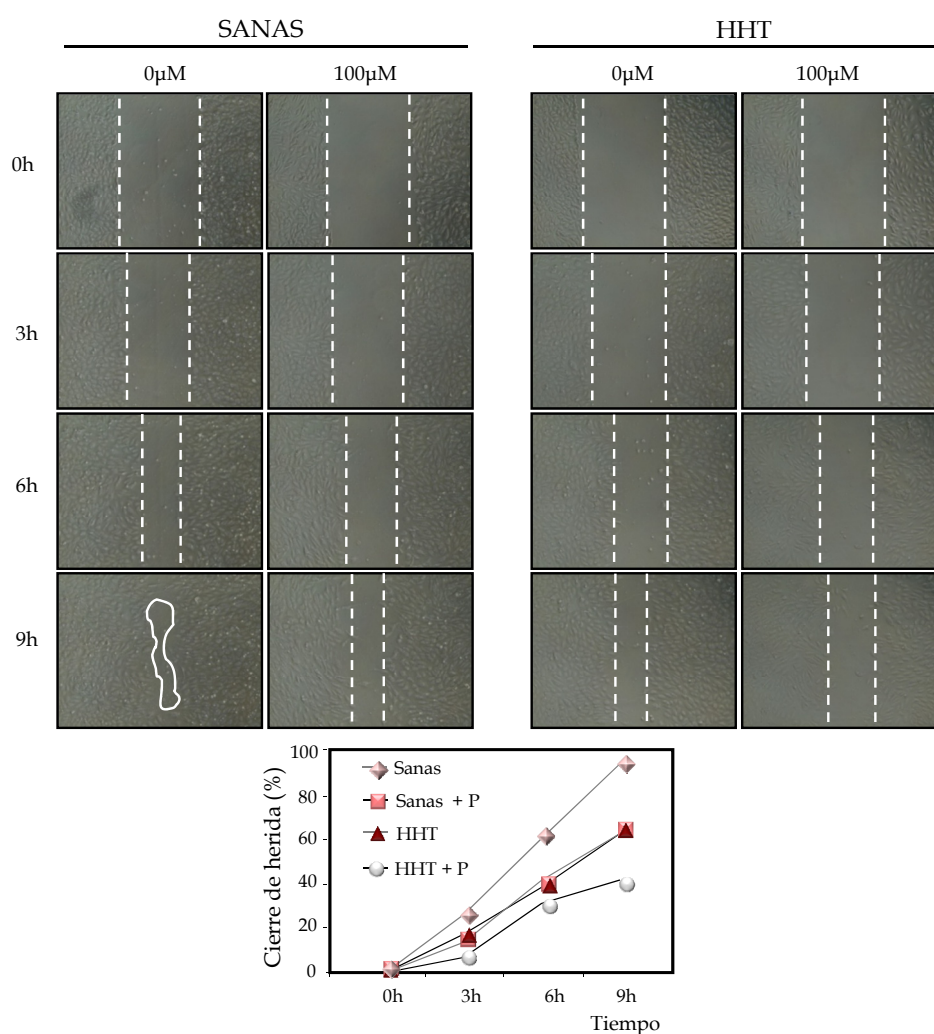


Figura 36. Propranolol disminuye también la migración en HUVECs HHT. El tratamiento con Propranolol tras realizar la herida en la monocapa endotelial, provoca un retraso en la migración celular, cerrando la herida horas después que la condición control. En la parte de abajo se muestra el histograma de la distancia migrada por las células en cada condición.

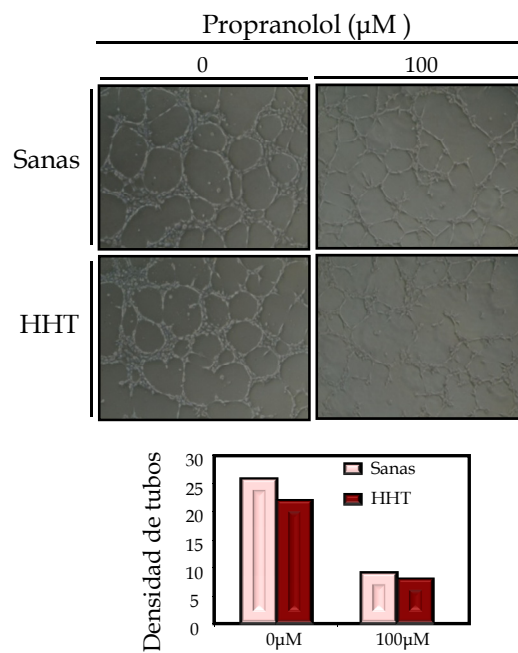


Figura 37. Propranolol disminuye la formación de tubos en HUVECs HHT. Seis horas después de que las células fueran depositadas sobre la base de matrigel y tratadas con Propranolol observamos que hay una inhibición en la formación de la red tubular. Como se observa en el gráfico inferior existe menos cantidad de tubos completamente cerrados cuando las células reciben tratamiento de Propranolol. HUVECs que no han recibido tratamiento, con y sin HHT, son capaces de formar una red tubular completa.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. Búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento en HHT

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria es una enfermedad genética caracterizada fundamentalmente por alteraciones en la estabilidad de los capilares y en el remodelado vascular. La señalización de TGF- β en células endoteliales juega un papel crucial en la angiogénesis y en el restablecimiento de la vasculatura durante el desarrollo. En el individuo adulto, también regula la expresión de genes diana implicados en las fases de activación y resolución de la angiogénesis. Durante la fase de activación, las células endoteliales desorganizan la membrana basal y degradan la matriz extracelular en los puntos de migración celular y forman el lumen. La existencia de un preciso balance entre proteasas y antiproteasas es necesario para que haya un estrecho control de la zona dónde se produce la degradación. En la fase de resolución o maduración, las células dejan de migrar y proliferar, para reconstituir la membrana basal y generar el nuevo vaso. En la zona de elongación se liberarán factores proangiogénicos de forma local, mientras que en la zona recién formada, se favorece el reclutamiento de pericitos y células de músculo liso vascular, la síntesis de matriz y la organización de la lámina basal, con la consecuente estabilización del vaso. Dos vías distintas de señalización de TGF- β , son las responsables de ambas fases de la angiogénesis en células endoteliales. Estas se activan mediante los receptores ALK1 y ALK5, que ejercen efectos opuestos sobre la proliferación y la migración en estas células (Goumans y col., 2002; Goumans y col., 2003a). En la formación de los vasos existe una síntesis simultánea de factores pro y antiangiogénicos, actuando de forma local. La liberación de estos factores con actividades opuestas, de forma muy controlada, puede explicar la regulación tan estrecha que existe entre los propios componentes de las vías de señalización de TGF- β . Endoglin y ALK1 se regulan positivamente entre ellos, pero también estimulan la expresión de ALK5, permitiendo así el control de los distintos procesos implicados en la angiogénesis. Cuando uno de estos componentes tiene alterada su expresión, como es el caso de la HHT, esta regulación mutua entre los distintos componentes de las vías, se ve alterada. La

presencia de una mutación en Endoglin o en ALK1, normalmente conduce a niveles más bajos de ambas proteínas (haploinsuficiencia), dándose lugar una señalización menos potente lo que lleva a una regulación defectuosa de la vía de ALK5, por lo que al final todos los procesos implicados en angiogénesis, regulados por TGF- β , se van a ver alterados.

La haploinsuficiencia está considerada como el mecanismo causante de la HHT. El 90% de los pacientes HHT tienen mutaciones en *Endoglin* o *ALK1*. Estas alteraciones en estos receptores endoteliales de TGF- β , van a debilitar el endotelio vascular, predisponiéndolo a la formación de lesiones. Actualmente, uno de los enfoques terapéuticos más importantes es encontrar fármacos que sean capaces de aumentar la expresión del alelo sano del gen mutado en esta enfermedad. Se sabe que numerosos factores aumentan la regulación transcripcional de *Endoglin* como son: TGF- β , agonistas de LXR α , hypoxia (HIF-1 α), Sp1, o factores tipo KLF6 (Botella y col., 2001; Botella y col., 2002; Henry-Berger y col., 2008; Sanchez-Elsner y col., 2002), aunque todavía quedan muchos por conocer. Por otro lado, se sabe menos de la regulación transcripcional de *ACVRL1*, aunque recientemente se ha revelado que Sp1 también se encuentra implicado en su regulación (Garrido-Martin y col., 2010).

Mientras que el TGF- β 1 podría ser una terapia interesante para los pacientes de HHT que aumente la actividad de los promotores de ambos genes, las múltiples acciones que esta citoquina lleva a cabo en distintos tipos celulares del organismo hacen inviable esta opción. Si bien, para grandes malformaciones vasculares de órganos internos hay opciones quirúrgicas satisfactorias, las epistaxis crecientes con la edad, permanecen como el síntoma más discapacitante de la HHT. Por tanto, es necesario buscar terapias que contrarresten estos sangrados de los pacientes. Los fármacos candidatos pueden actuar por alguna de estas 3 estrategias: i) aumentando los niveles ENG y ALK1 para compensar la haploinsuficiencia, ii) estimulando la cascada de procoagulación inhibiendo la fibrinólisis y evitando el sangrado (antifibrinolíticos), iii) normalizando la vasculatura anormal de la mucosa de los pacientes (antiangiogénicos) (Figura 38).

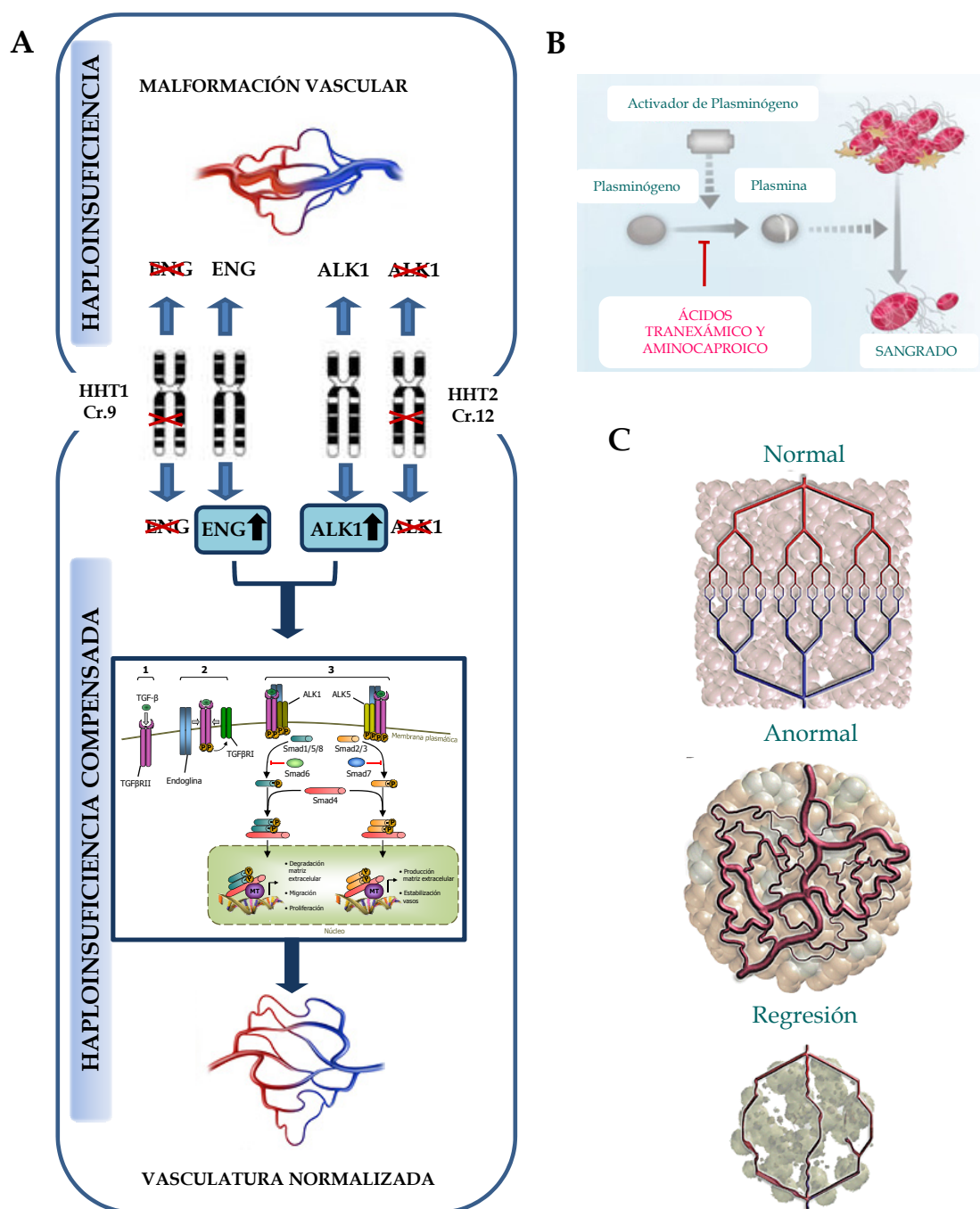


Figura 38. Estrategias de actuación de los fármacos estudiados en HHT. A) Compensación de la haploinsuficiencia. El fármaco actúa aumentando la expresión de los genes *ENG* o *ALK1* en la copia no mutada del alelo sano, existiendo de esta manera más cantidad de ambas proteínas para una mejor señalización de TGF- β y una mejor formación de nuevos vasos. **B)** Acción antifibrinolítica. Tanto el ácido tranexámico como el aminocaproico impiden el paso del plasminógeno a plasmina, reduciéndose así la lisis del coágulo de fibrina y por tanto del sangrado. **C)** Estrategia antiangiogénica; hace desaparecer la vasculatura anormal ya existente, o bien la normaliza.

En los últimos años, diversos fármacos se han estado utilizando como terapia en HHT, por su capacidad de disminuir la cantidad y la frecuencia de las epistaxis y cuando se presentan, también de los sangrados gastrointestinales. Medicamentos antifibrinolíticos como el ácido aminocaproico o el ácido tranexámico administrado sistémicamente provocan una mejoría en las epistaxis y en la anemia asociada a estos sangrados, además de aumentar la expresión de las proteínas ENG y ALK1 en la membrana de las células endoteliales (Fernandez y col., 2007b; Morales-Angulo y col., 2007). Pero los tratamientos con antifibrinolíticos, no deben administrarse a pacientes susceptibles de padecer trombosis, como serían pacientes con niveles elevados de los factores de coagulación Factor V, VIII y Von Willebrand. En estos casos, el tratamiento antifibrinolítico favorecería el tromboembolismo venoso (Ghosh y Ghosh, 2008; Shovlin y col., 2007). Por este motivo, los pacientes que vayan a ser tratados con antifibrinolíticos deben tener estudios analíticos de estos factores antes del tratamiento.

1.1 Compensación de la haploinsuficiencia como mejora del proceso angiogénico

1.1.1 Raloxifeno, primer medicamento huérfano en HHT

Los ensayos clínicos realizados con moduladores de receptores estrogénicos como Tamoxifeno o Raloxifeno, en mujeres postmenopáusicas, mejoran la incidencia de osteoporosis al tiempo que disminuyen la probabilidad de que estas mujeres desarrollen cáncer de mama y una menor cantidad de fracturas a consecuencia de la osteoporosis (Cummings y col., 1999; Ettinger y col., 1999; Mosca y col., 2009; Runowicz y col., 2011). Cuando se han tratado con Tamoxifeno mujeres con cáncer de mama y HHT se ha observado que este SERM además de actuar como tratamiento del tumor también atenúa los síntomas de HHT, disminuyendo drásticamente las epistaxis (Jameson y Cave, 2004; Zacharski y col., 2001). Con estos antecedentes y dado que el Raloxifeno tiene menos efectos secundarios que el Tamoxifeno (Runowicz y col., 2011), en Sierrallana se comenzó un estudio observacional con Raloxifeno y mujeres postmenopáusicas afectadas de HHT. La indicación del tratamiento fue deficiencia en mineralización de hueso y epistaxis de moderada a severa. Tras 18 meses de tratamiento las pacientes mostraron una disminución tanto en frecuencia como en cantidad de los sangrados. En este estudio, ninguna de las 19 pacientes mostró niveles

anormalmente alterados, ni antes ni después del tratamiento, no apareciendo ningún efecto adverso grave. Por otro lado, los resultados en los ensayos *in vitro* muestran que el Raloxifeno provocaba un aumento en la expresión de las proteínas de ENG y ALK1, debido a un aumento en la regulación transcripcional de ambos genes (Albiñana y col., 2010).

Los SERM mimetizan las funciones agonistas del estradiol, principal ligando de los receptores estrogénicos en la inhibición de la reabsorción del hueso o en la bajada de los niveles de colesterol en suero. La diferencia con el Estradiol es que no afecta ni a útero ni a mama, ya que los SERMs son ligandos de los $ER\alpha$ y $ER\beta$ que tienen propiedades agonistas y antagonistas del estradiol según el tejido. Los efectos de estos SERM sobre distintos tejidos dependen de las diferentes formas de interacción con el receptor y con otros co-activadores o co-represores unidos al promotor del gen. En células mamarias, el Tamoxifeno y el Raloxifeno actúan de manera antagonista reclutando co-represores que se unen a los promotores de genes diana. Por el contrario, en células del útero, el Tamoxifeno, pero no el Raloxifeno, recluta el co-activador SRC-1 del receptor de esteroide (Shang y Brown, 2002). Scafonas y colaboradores han demostrado cómo Estradiol y los SERMs actúan como agonistas reprimiendo la transcripción controlada por $ER\alpha$ del promotor de MMP1 (Scafonas y col., 2008). Tal y como hemos visto en los resultados, el mecanismo de transcripción en el que está implicado Raloxifeno promueve el aumento de expresión de *Endoglin* y *ALK1* en células endoteliales. El promotor de *Endoglin* sólo contiene una secuencia simple de reconocimiento de estrógenos donde no se puede unir el dímero de $ER\alpha$ (posición -308) (Rius y col., 1998) ni tampoco tiene ningún elemento respuesta a Raloxifeno (RRE). El Raloxifeno podría estar uniéndose al promotor de ENG o ALK1 indirectamente mediante la interacción con otro factor esencial en la transcripción (Cheskis y col., 2007; Zhao y col., 2010), como es el caso de genes con secuencias de unión para Sp1 o AP1 (Paech y col., 1997; Webb y col., 1995). Por ejemplo, en el promotor del ligando Fas, la estimulación de su expresión mediada por estrógenos es llevada a cabo mediante la unión de Sp1 al promotor (Catalano y col., 2007). Sp1 es un factor imprescindible en la transcripción basal de *Endoglin* y *ALK1* y también para el efecto estimulador de TGF- β . Como se muestra en los resultados, ambos factores, Sp1 y $ER\alpha$, se encuentran unidos al promotor de *Endoglin*. Hardman y colaboradores publicaron efectos beneficiosos del Tamoxifeno y Raloxifeno en heridas cutáneas, y como se muestran en esta tesis, el Raloxifeno es capaz de estimular la migración favoreciendo el cierre de la

discontinuidad de monocapa endotelial (Hardman y col., 2008). Además el Raloxifeno induce la actividad angiogénica dando lugar a una rápida formación de tubos de células endoteliales, pues Raloxifeno aumenta la expresión de ENG y ALK1, proteínas ambas proangiogénicas (Li y col., 1999; Fonsatti y col., 2003; Lebrin y col., 2005).

En los pacientes estudiados, Raloxifeno disminuía las epistaxis, por lo que sería una terapia interesante para los sangrados nasales. Un factor importante a controlar sería la incidencia de tromboembolismo venoso (Adomaityte y col., 2008; Barret Connor y col., 2006; Mosca y col., 2001). La administración de Raloxifeno estaría promoviendo un aumento en los niveles de factores de coagulación VIII, XI y XII (Azevedo y col., 2003; Azevedo y col., 2005). Los pacientes HHT tienen niveles algo más altos de lo normal en los factores V, VIII y von Willebrand, por lo que el Raloxifeno habría que administrarlo con controles especiales (Shovlin y col., 2007). En el estudio realizado en el Hospital de Sierrallana, ninguna de las 19 pacientes mostró niveles alterados, ni antes ni después, del tratamiento en ningún factor de coagulación. Sólo se observó como efecto adverso un leve incremento en los niveles de transaminasas en dos pacientes, sin llegar a afectar a la función hepática, edemas periféricos, náuseas y algún episodio de insomnio. El tratamiento con Raloxifeno debería basarse en un equilibrio entre los beneficios (disminución de los sangrados) y los posibles efectos adversos. Si los estrógenos verdaderamente fueran capaces de contrarrestar la haploinsuficiencia en HHT, no solo podrían usarse a nivel terapéutico sino también como profilaxis.

Tanto los resultados clínicos como moleculares se presentaron a la Agencia Europea del Medicamento (EMA, *European Medicines Agency*) y a la americana (FDA, *Food and Drug Administration*), consiguiéndose la designación de medicamento huérfano para el hidrocloreto de Raloxifeno en el tratamiento de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria en ambas agencias (EU 3/10/730; FDA/10/3099).

1.1.2 Estríol incrementa la resistencia del epitelio nasal y aumenta la expresión de ENG

Los estrógenos han mostrado un efecto altamente proliferativo en los epitelios endometrial, vaginal y uterino, resultando en un engrosamiento de la mucosa. Esta propiedad de los derivados del 17 β -Estradiol se ha utilizado en Dermatología y en Ginecología, observándose que terapia tópica estrogénica produce estimulación de

síntesis de colágeno, y engrosamiento del epitelio (Chang y col., 1995; Creidi y col., 1994; Varila y col., 1995).

A consecuencia de estos resultados Sadick y colaboradores analizaron el efecto del estrógeno Estriol aplicado tópicamente en la cavidad nasal para disminuir las epistaxis. Tras 6 meses de aplicación, observaron un engrosamiento de la mucosa y una disminución en la población de los cilios, cambio que aumentó a los 12 meses donde el epitelio pasó a ser escamoso, queratinizado y estratificado. Este engrosamiento de la pared epitelial cubriría las telangiectasias de la cavidad nasal, evitando de esta manera cualquier agresión sobre ellas y el posterior sangrado. Es de resaltar que Estriol es el metabolito del Estradiol con menor actividad, de hecho tiene menos de una décima parte de la potencia del Estradiol, por lo que se metaboliza más rápido y tiene menos afinidad por los receptores de estrógeno (Sadick y col., 2003; Sadick y col., 2005).

Raloxifeno, aumenta la expresión de ENG y ALK1 en células HMEC-1 mejorando la función endotelial, mientras que Estriol sólo aumenta significativamente la expresión de Endogлина a las concentraciones 0,2-1nM, no observándose diferencias en los niveles de ALK1. Quizás este derivado del Estradiol no cause los mismos efectos que el Raloxifeno sobre la expresión de estas proteínas proangiogénicas en células endoteliales, porque es un derivado con menos actividad que el Raloxifeno.

1.1.3 FK506, inmunosupresor de elección en trasplantes de HHT

El inmunosupresor FK506, fue utilizado junto con Sirolimus y aspirina, en el caso de una paciente HHT de 53 años a la que se le trasplantó el hígado. Tras el tratamiento inmunosupresor, los síntomas de HHT fueron desapareciendo desde el principio, incluyendo la anemia, las epistaxis y las telangiectasias de la piel y mucosas (Skaro y col., 2006). Aunque el simple trasplante podría hacer desaparecer las telangiectasias hepáticas, no quiere decir que también tuvieran que desaparecer la angiodisplasia o las hemorragias de la mucosa, consecuencia de la HHT. Skaro y colaboradores sugieren que la reducción de las telangiectasias y las hemorragias se puede deber a la inhibición de la vía del VEGF, ya que Sirolimus actúa sobre ella, inhibiendo a la quinasa mTOR, mediadora de la ruta (Guba y col., 2002; Schäffer y col., 2007; Laschke y col., 2006; Wiedrecht y col., 1995), pero en esta tesis hemos observado que FK506 también puede colaborar sinérgicamente con la acción del Sirolimus ya que aumenta los niveles de las

proteínas ENG y ALK1 en la membrana de las células endoteliales, favoreciendo una adecuada angiogénesis.

Tanto Sirolimus como FK506, se unen a su receptor citoplasmático, la inmunofilina FKBP12, pero ambos complejos van a actuar sobre rutas distintas. Sirolimus/FKBP12 inhibe a mTOR, mientras que FK506/FKBP12 actúa inhibiendo a la fosfatasa Calcineurina. Las inmunofilinas son una familia de proteínas conocidas por ser receptores de inmunosupresores como la Ciclosporina, el Sirolimus o el Tacrolimus, aunque también tienen otras funciones como regular la permeabilidad de las mitocondrias, modular la estabilidad de los canales de iones, o funcionar como chaperonas para determinadas proteínas (Udina y Navarro, 2002). FK506 va a secuestrar a FKBP12, que además de su receptor, es también inhibidor del RI de TGF- β . El FK506 y el TGF- β compiten con la inmunofilina FKBP12 por el RI (Udina y Navarro, 2002). Giordano y colaboradores demostraron que FK506 aumentaba la fosforilación de Smad2/3 en VSMCs, ya que secuestraba al FKBP12 que estaba inhibiendo al RI, dejando así la ruta de señalización de TGF- β activa (Giordano y col., 2008). El tratamiento con FK506 de células endoteliales, desencadena la activación del receptor específico del endotelio ALK1, como vemos en los ensayos de luciferasa a través del reportero BREluc y del promotor natural Id1, en el reportero Id1luc. La ruta de ALK5 está inhibida ya que se muestra que las actividades de reporteros, CAGAluc y PAI1luc de su ruta, están disminuidas tras el tratamiento del inmunosupresor. Estos datos se corresponden con el equilibrio que existe entre ALK1 y ALK5 en células endoteliales (Blanco y col., 2005; Lebrin y col., 2004; Shovlin, 2010). Los resultados de mejoría que en la paciente de HHT trasplantada, tratada con la combinación Sirolimus/FK506, se deberían no solo al efecto antiangiogénico del Sirolimus sino también a que FK506 provoca un aumento de expresión de ENG y ALK1 en la membrana de las células endoteliales (Albiñana y col., 2011). Debido a que la haploinsuficiencia de ambas proteínas es la causa de HHT1 y HHT2, el aumento de expresión de éstas tras el tratamiento con FK506 puede compensar esta haploinsuficiencia. Como vemos en este trabajo Tacrolimus es capaz de estimular la ruta de señalización de TGF- β mediante la unión a FKBP12. De esta manera el RI queda libre y la ruta de TGF- β /ALK1/Smad1/5/8 queda activada. Como consecuencia del tratamiento las funciones celulares mediadas por la ruta ALK1/Smad1/5/8 quedan potenciadas; migración y angiogénesis. Todos los resultados mostrados apoyan el uso del FK506/Sirolimus sobre otros inmunosupresores en pacientes HHT sujetos a trasplantes

ya que no sólo evitarían el rechazo al nuevo órgano sino que también mejorarían los síntomas derivados de la HHT.

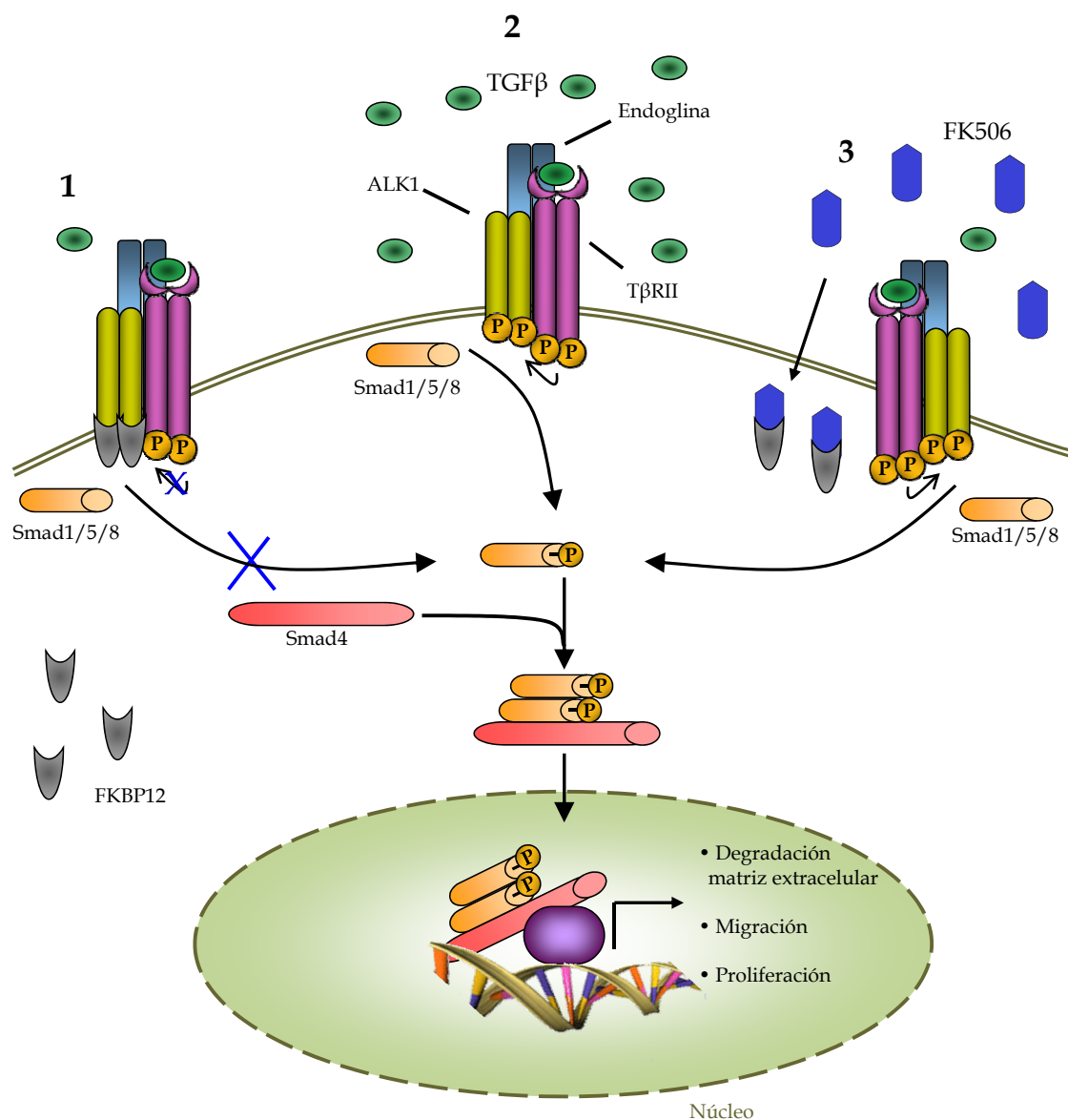


Figura 39. Modo de actuación de FK506. 1. Cuando la célula no recibe señales angiogénicas, el RI se encuentra inhibido por FKBP12, no activándose la ruta. 2. Con la presencia del factor TGF- β , la ruta se activará con la consecuente fosforilación de las Smad y la expresión de los genes diana. 3. Tras tratamiento con el inmunosupresor FK506, observamos la misma activación de la ruta, ya que este secuestra al inhibidor del RI, FKBP12, pudiendo este fosforilar a las Smad.

1.1.4 N-acetilcisteína mejora la función de Endoglin

N-acetilcisteína es uno de los antioxidantes más conocidos a la hora de eliminar las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se acumulan en las células ya que no causa efectos adversos. Gussem y colaboradores realizaron un estudio de 43 pacientes HHT

con el objetivo de observar si estos pacientes experimentaban una disminución en las epistaxis. Tras 12 semanas recibiendo 600 mg/día se observó una tendencia a la disminución en la frecuencia, severidad y duración de las epistaxis pero que solo era estadísticamente significativa en el grupo de los varones con mutación en ENG (HHT1).

A nivel molecular se observa que los niveles de ENG aumentan con tratamientos de NAC y los niveles de ALK1 disminuyen, tanto al estudiar la cantidad de ARNm como la expresión en la superficie de las células HMEC-1. Pacientes HHT tratados con NAC, estarían experimentando un aumento en la expresión de ENG (en el alelo sano en el caso de HHT1 y en ambas copias en HHT2) y una leve disminución de la expresión de ALK1 (en ambos alelos si el paciente es HHT1, o en el alelo sano si es HHT2). En cualquier caso, va a existir más cantidad de Endoglin en la célula que la que existe en células no tratadas. Estos resultados podrían justificar la disminución de los sangrados en los pacientes HHT1.

También hay que tener en cuenta que un factor que contribuye a la disminución de la concentración de las especies reactivas del oxígeno es la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS), encargada de producir óxido nítrico (NO) en el endotelio, para regular la función vascular e inducir vasodilatación. La enzima eNOS es estabilizada por Endoglin, favoreciendo el acoplamiento de esta enzima a la chaperona HSP90 e induciendo la producción de NO (Toporsian y col., 2005). La síntesis de NO se encuentra disminuida en pacientes HHT por desacoplamiento de la enzima, debido a la haploinsuficiencia de Endoglin en ese complejo y también porque existe una bajada de expresión de eNOS en los pacientes HHT (Fernandez-L y col., 2007a; Jerkic y col., 2004; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). Al existir menos actividad de eNOS y menos niveles de NO, aumenta por tanto la cantidad de ROS, pudiendo causar daños en la célula por estrés oxidativo.

Ya que Endoglin actúa modulando la función de ALK1 en el complejo receptor de TGF- β , esta proteína al encontrarse en niveles superiores tras recibir tratamiento de NAC, estaría mejorando la angiogénesis. Los resultados obtenidos con NAC, pueden deberse a la existencia en el promotor de Endoglin de elementos respuesta al factor de transcripción NF- κ B (posiciones -218 y +27 (GGGAGCTCCC)). NF- κ B se activa por el factor TNF- α , entre otros. Li y colaboradores mostraron que el tratamiento con TNF- α a células endoteliales, daba lugar a una disminución en los niveles de la proteína de Endoglin, hipotetizando la implicación de alguna proteasa que pudiera cortar ENG en

membrana (Li y col., 2003). Otra posibilidad es que NF- κ B esté actuando como factor de transcripción inhibitorio en el gen de ENG, por lo que TNF- α disminuye su expresión en membrana y NAC la aumenta.

Las especies reactivas del oxígeno son las responsables de la activación de muchos factores de transcripción, como NF- κ B y AP1 (Kunsch y Medford, 1999). El factor de transcripción NF- κ B, se encuentra inactivo en el citoplasma unido a su inhibidor I κ B. Las moléculas que activan su señalización, como es el caso de TNF- α , van a fosforilar a la kinasa IKK para que esta al fosforilar a I κ B se separe de NF- κ B, se degrade en el proteosoma y de esta manera quede libre NF- κ B para traslocarse al núcleo y activar la expresión de sus genes diana. Este mecanismo de activación, que lleva a la degradación de I κ B y a la traslocación nuclear de NF- κ B, también estaría relacionado con las ROS (Kunsch y Medford, 1999; Li y Karin, 1999). Se ha comprobado la implicación de ROS como activadores comunes de NF- κ B en muchos estudios, inducidas por sustancias como TNF- α , IL-1 β , luz ultravioleta e hidroperóxidos y la posterior inhibición de la activación de NF- κ B por distintos antioxidantes como NAC, ditiocarbamatos (PDTC), vitamina E y algunos quelantes metálicos.

La mayoría de los resultados indican que el estrés oxidativo induciría y los antioxidantes impedirían, la traslocación nuclear de NF- κ B. Células HeLa tratadas con NAC, tienen afectado el reconocimiento del complejo IKK y I κ B, lo que produciría menos niveles de fosforilación de I κ B (Li y Karin, 1999). NAC, al secuestrar las especies reactivas que van a activar al factor de transcripción NF- κ B o que van a permitir la fosforilación de I κ B, hace que la señalización de la ruta de inflamación se vea disminuida. Por tanto no se activará la expresión de genes como ICAM, VCAM, PECAM, interleuquinas, y citoquinas, responsables de la respuesta inflamatoria. Puede que esta reducción en su actividad transcripcional se traduzca en la disminución de la inflamación de las mucosas, favoreciendo así la disminución de los sangrados observada en los pacientes en el ensayo de Gussem y colaboradores. El hecho de que en condiciones proinflamatorias (TNF α), la expresión de Endogлина disminuya, podría querer decir que tratamientos inhibidores de la inflamación (activación de NF- κ B), puedan aumentar la expresión de Endogлина, mejorando la haploinsuficiencia de los pacientes, normalizando en parte la angiogénesis defectuosa disminuyendo la inflamación y mejorando los sangrados.

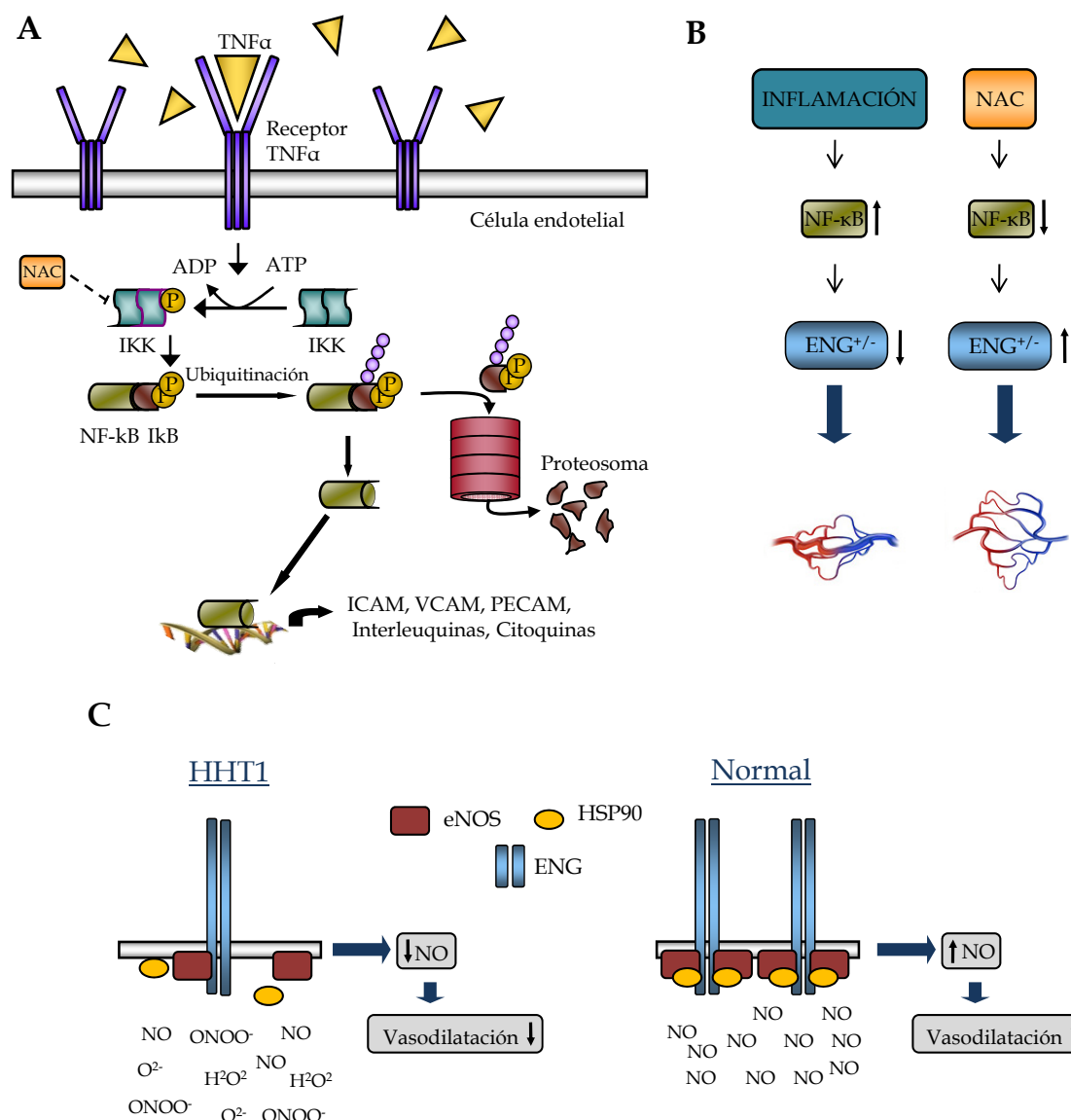


Figura 40. Modelo de actuación de N-acetilcisteína. **A)** NAC, ya sea porque secuestra las especies reactivas de oxígeno, influyendo directamente en la actividad de NF- κ B, o porque dificulta la unión de IKK a I κ B, con la consecuente no liberación de NF- κ B para su traslocación al núcleo, este antioxidante está afectando la ruta de inflamación de TNF- α . **B)** La inflamación disminuye los niveles de Endogлина en la superficie celular, pudiéndose considerar como el segundo evento necesario para la aparición de malformaciones arteriovenosas en pacientes HHT. NAC, al disminuir esta inflamación y compensar la haploinsuficiencia, retrasaría o anularía la aparición de esa fistula. **C)** NAC, al mejorar la haploinsuficiencia, normalizaría el desacoplamiento existente en pacientes HHT1 entre eNOS/HSP90/ENG a causa de la falta de ENG. Los niveles de NO aumentarían mejorando la vasodilatación en los pacientes.

1.2 Normalización de la angiogénesis y formación de una nueva red vascular

1.2.1 Papel dual del fitoestrógeno Genisteína

La población oriental posee 30 veces más Genisteína en la orina que la población occidental ya que taiwaneses y coreanos consumen de 20-150 mg/día de isoflavonas, y los japoneses hasta 200 mg/día. En cambio, la dieta occidental normal contiene sólo 5 mg/día de isoflavonas (Murkies y col., 1998). Estos datos se relacionan con que la población femenina oriental tiene menos síntomas postmenopáusicos, menos riesgo de padecer cáncer de mama, y cuando aparece tienen mejor pronóstico y con menos metástasis (Boulet y col., 1994; Fotsis y col., 1995; Knight y Eden, 1995). Estudios realizados en mujeres postmenopáusicas demuestran que la ingestión de 45 gr de harina de soja o de pan enriquecido con soja, disminuye los sofocos característicos de esta etapa, aumenta el contenido mineral de los huesos o disminuye la incidencia de enfermedades vasculares ya que disminuye el colesterol LDL y los triglicéridos (Anderson y col., 1995; Alekel y col., 2000; Dalais y col., 1998).

La genisteína como potente inhibidor de las proteínas con actividad tirosina quinasa (TK) (Akiyama y col., 1987; Nakashima y col., 1991), inhibe la activación de las células endoteliales mediada por VEGF a través de la disminución de la activación de JNK y p38 así como en la secreción y actividad de las MMP y del activador de plasminógeno uPA (Yu y col., 2010). También inhibe la activación de las rutas de señalización de NF- κ B y Akt, implicadas en el equilibrio homeostático entre la apoptosis y la supervivencia celular (El-Rayes y col., 2006; Li y Sarkar, 2002). Mejora la reparación de heridas cutáneas en ratones debido a su efecto antioxidante, que inhibe la actividad de NF- κ B reduciendo la expresión de TNF- α (Emmerson y col., 2010; Park y col., 2011). El tratamiento de células HMEC-1 con Genisteína, muestra una disminución en la velocidad de migración y en la tubulogénesis en tratamientos con dosis de 50-100 μ M de Genisteína. Esta inhibición de la angiogénesis no parece estar relacionada con la disminución de los genes proangiogénicos *ENG* y *ALK1*, ya que a estas dosis se produce un aumento en los niveles de estas proteínas. Genisteína estaría compensando la haploinsuficiencia, tanto de *ENG* como de *ALK1*, a altas dosis en las células endoteliales, pero Genisteína se comportaría a esas dosis altas como antiangiogénico, posiblemente mediante la inhibición de la ruta de VEGF (como observamos en los ensayos funcionales). Posiblemente la inhibición de la actividad TK, MAPK, HIF-1 α o MMPs, disminuye la actividad de VEGF en células endoteliales,

quedando así enmascarados los posibles efectos proangiogénicos derivados del aumento de ENG y ALK1 (Yu y col., 2010; Gacche y col., 2011). De esta manera, Genisteína podría actuar a nivel local en la mucosa nasal con propiedades antiangiogénicas eliminando la vasculatura anómala y proangiogénicas normalizando la vasculatura nueva.

1.2.2 Resveratrol como antiangiogénico

El cumestano Resveratrol inhibe múltiples rutas celulares, como entre otras la proliferación, la angiogénesis, la metástasis, la inflamación, modula el estado redox, actividad mitocondrial, el daño al ADN, y estimula la osteogénesis (Kraft y col., 2009; Vang y col., 2011). Existen muy pocas publicaciones de estudios humanos donde se demuestren los beneficios ya estudiados en modelos del laboratorio, aunque en el año 2011 se hayan iniciado multitud de ensayos con este fitoestrógeno (Smoliga y col., 2011). Existen más de 4.000 publicaciones en pubmed sobre Resveratrol, un gran porcentaje de ellas lo relacionan con enfermedades asociadas a la edad, proponiéndolo como un suplemento de la dieta. Muchos de los mecanismos por los que actúa tienen una fuerte implicación en la prevención del cáncer y en su tratamiento. El Resveratrol disminuye la proliferación celular en diversos tipos de cáncer disminuyendo la expresión de cyclina E y D1 y Cdk2 y Cdk4 y aumentando la expresión del inhibidor de Cdk p21, mediante el aumento de expresión de p53, principal regulador en la vía intrínseca o mitocondrial de apoptosis. El Resveratrol inhibe la ruta de las MAPK, aumentando la expresión de p53, y éste a su vez, activa Bax, Bak, Apaf-1, Bcl-2 y disminuye Smac/Diablo (Agarwal y col., 2004; Kim y col., 2003a; Kim y col., 2003b; Narayanan y col., 2003). En la vía extrínseca de apoptosis, o también llamada ruta de los receptores de muerte, el Resveratrol actúa aumentando la expresión de FasL en algunos tipos de células tumorales (Clement y col., 1998).

Resveratrol inhibe la vasculogénesis inducida por VEGF y FGF-2 en la córnea de ratones alimentados con solución bebible con Resveratrol ya que al inhibir los receptores, disminuye la fosforilación de las MAPK inducida por los factores de crecimiento. Inhibe el crecimiento de fibrosarcoma en ratón y ralentiza el cierre de heridas (Brakenhielm y col., 2001). Wang y colaboradores demostraron la implicación de este cumestano en la señalización de VEGF. Altas dosis de Resveratrol (20µM)

inactivan las rutas de AKT y ERK en células endoteliales humanas, responsables de la inhibición de la GSK3 β (kinasa glicogeno sintasa 3 β), un inhibidor del factor de transcripción β -catenina. Tras tratamiento con Resveratrol, GSK3 β queda activa, inactivando a β -catenina, importante factor que unido a LEF/TCF, promueve la transcripción de VEGF (Wang y col., 2010). Las metaloproteasas MMP2 y MMP9, factores importantes en la angiogénesis, capaces de degradar el colágeno IV, componente principal de la membrana basal, son inhibidas, ya que Resveratrol disminuye la activación de NF-kB y de AP1, ambos factores estimuladores del promotor de estas MMPs. En conclusión, Resveratrol provoca la inhibición en la migración celular necesaria para la progresión de la angiogénesis (Athar y col., 2009; Cao y col., 2005; Hu y col., 2007; Kundu y col. 2006; Sun y col., 2006).

La inhibición de la angiogénesis promovida por Resveratrol, no sólo sería aplicable para detener el progreso de los tumores, sino que también podría ser útil en otras enfermedades dónde la angiogénesis anormal juega un papel patológico importante como es el caso de la HHT. *ENG* y *ALK1*, genes causantes de esta enfermedad por mutación, no muestran diferencias en sus niveles de expresión, tras tratamientos con Resveratrol en células HMEC-1. En células endoteliales HUVECs hemos observado que tratamientos de 10-100 μ M, disminuyen significativamente la formación de tubos al igual que la velocidad de migración de las células, en una manera dosis-dependiente. Al no existir diferencias significativas en los niveles de *ENG* y *ALK1* en estas dosis de Resveratrol en las que se observa efecto antiangiogénico y antimigratorio, postulamos que la antiangiogénesis es independiente de *ENG* y *ALK1*. La inhibición de ambos procesos, probablemente ocurre por la inhibición de VEGF. Resveratrol pudiera utilizarse como antiangiogénico en pacientes de HHT al igual que en el caso de Genisteína con uso local en la mucosa nasal.

1.2.3 Propranolol, nuevo candidato para el tratamiento local de las epistaxis

Una de las aplicaciones más actuales del Propranolol es su uso en Hemangiomas Infantiles, que son tumores vasculares benignos que proliferan bajo las órdenes de VEGF y FGF, factores cuyas rutas de señalización serán inhibidas por el Propranolol (Sanchez-Carpintero y col., 2011; Sanchez-Perez y col., 2009; Storch y Hoeger, 2010; Leaute-Labreze y col., 2008; Lamy y col., 2010). Nada se sabe acerca del Propranolol en

otras enfermedades vasculares, como puede ser la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. Ya que la HHT está causada por un desequilibrio del proceso angiogénico, dando lugar a malformaciones vasculares, los fármacos inhibidores de la angiogénesis pueden ser una opción para disminuir la vasculatura anormal. Ensayos con los fármacos antiangiogénicos Bevacizumab/Avastin y Talidomida, en pacientes HHT con sangrados severos, dieron lugar a una disminución en las epistaxis y de los sangrados gastrointestinales en el caso de Bevacizumab (Fodstad y col., 2011; Patrizia y col., 2011) y a una normalización de los vasos, reduciéndose también las epistaxis en un grupo reducido de 7 pacientes HHT, en el caso de la Talidomida (Lebrin y col., 2010). Sin embargo, estos fármacos antiangiogénicos afectan a multitud de procesos fisiológicos, ocasionando diversos efectos secundarios. La necesidad de encontrar un fármaco antiangiogénico adecuado para la HHT, nos ha llevado a realizar experimentos con Propranolol. Este β -bloqueante se está utilizando en Hemangiomas Infantiles desde 2008, en un rango de dosis amplio, dentro del cual no ha ocasionado efectos adversos, por lo que podría ser un candidato para normalizar la vasculatura excesiva y anormal de los pacientes, eliminando las epistaxis derivadas de las telangiectasias.

Propranolol disminuye la expresión de Endoglina y ALK1 en HMEC-1 y esto es debido a una bajada en los niveles de ARNm de ambos genes y también una disminución en la actividad de ambos promotores. Parece estar actuando como antiangiogénico, por doble vía, no sólo inhibiendo el VEGF, sino también estas dos proteínas proangiogénicas (Albiñana y col., 2012). Las células endoteliales HMEC-1 tratadas con Propranolol, también muestran niveles disminuidos de MMP2 y MMP9, como ya describió Anabbi y colaboradores, contribuyendo a la inhibición de la angiogénesis (Annabi y col., 2009; Gialeli y col., 2010). En pacientes HHT los niveles de ENG o ALK1 ya son más bajos que en la población normal por lo que Propranolol actuaría sinérgicamente disminuyéndolos más todavía, reduciendo así la migración y la tubulogénesis (Figura 6).

Los pacientes HHT tienen epistaxis frecuentes a consecuencia de la vasculatura anormal de la mucosa nasal y la alta actividad fibrinolítica en las telangiectasias (Kwaan y Silverman, 1973; Sabba y col., 2001). En este sentido, Peracchia y colaboradores, publicaron que Propranolol aumenta la expresión del activador de plasminógeno uroquinasa (uPA), proteína involucrada en la fibrinólisis (Peracchia y col., 1989). Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en nuestro laboratorio, ya que observamos que este fármaco tiene propiedades profibrinolíticas en las células

endoteliales HMEC-1. En estas células la expresión de uPA no está afectada, pero sí la de su inhibidor PAI-1, que va disminuyendo al ir aumentando la dosis de Propranolol, tanto a nivel del ARNm como a nivel de actividad de promotor. La disminución de la proteína PAI-1, inhibidor natural de uPA, da lugar a un aumento de proteína uPA activa, por lo que existirá un aumento en los niveles de fibrinólisis. En este punto, habría que añadir una nota de cautela en cuanto a la administración sistémica de Propranolol en pacientes de HHT. El uso compasivo de Propranolol en una niña de 5 años afectada de HHT con múltiples fístulas pulmonares, dio lugar a epistaxis y sangrados vaginales sin mejorar el problema pulmonar. El caso de otra paciente HHT de 42 años, a la que se le recetó Propranolol para el soplo de corazón y las arritmias que padecía, también provocó sangrados, dando lugar a un incremento en las epistaxis. Tras la retirada del tratamiento, los sangrados cesaron en el caso de la niña y se normalizaron en el caso de la mujer (comunicación personal a la Asociación Española de HHT). Personas que no padecen HHT, que no tienen alterada la actividad angiogénica ni fibrinolítica, no deberían sangrar, de hecho no existen publicaciones sobre ello.

Durante la escritura de esta tesis, un caso clínico de un paciente HHT tratado con Timolol tópico se ha publicado. Timolol es un β -bloqueante similar al Propranolol, que se usa en glaucoma y en hemangiomas superficiales. Este paciente de 48 años tenía 3-4 epistaxis al día con una duración de hasta 30 minutos y tras un mes de tratamiento con Timolol, 1 gota en cada cavidad nasal 3 veces al día, sus epistaxis disminuyeron hasta 1-2 a la semana, durando menos de 5 minutos. Este caso apoya a nivel clínico nuestros resultados *in vitro* en células endoteliales, que han alentado a realizar un estudio con pacientes HHT tratados con Propranolol en la mucosa nasal.

Propranolol es un medicamento más económico que otros antiangiogénicos como Bevacizumab y prácticamente no tiene efectos secundarios, por lo que podría ser administrado tópicamente en la mucosa nasal para normalizar la vasculatura y reducir las epistaxis. Además el tratamiento tópico debe ir acompañado por terapia antifibrinolítica (ácido tranexámico) para compensar los efectos profibrinolíticos que pudiera ocurrir *in vivo*, sobre todo en las primeras fases del tratamiento.

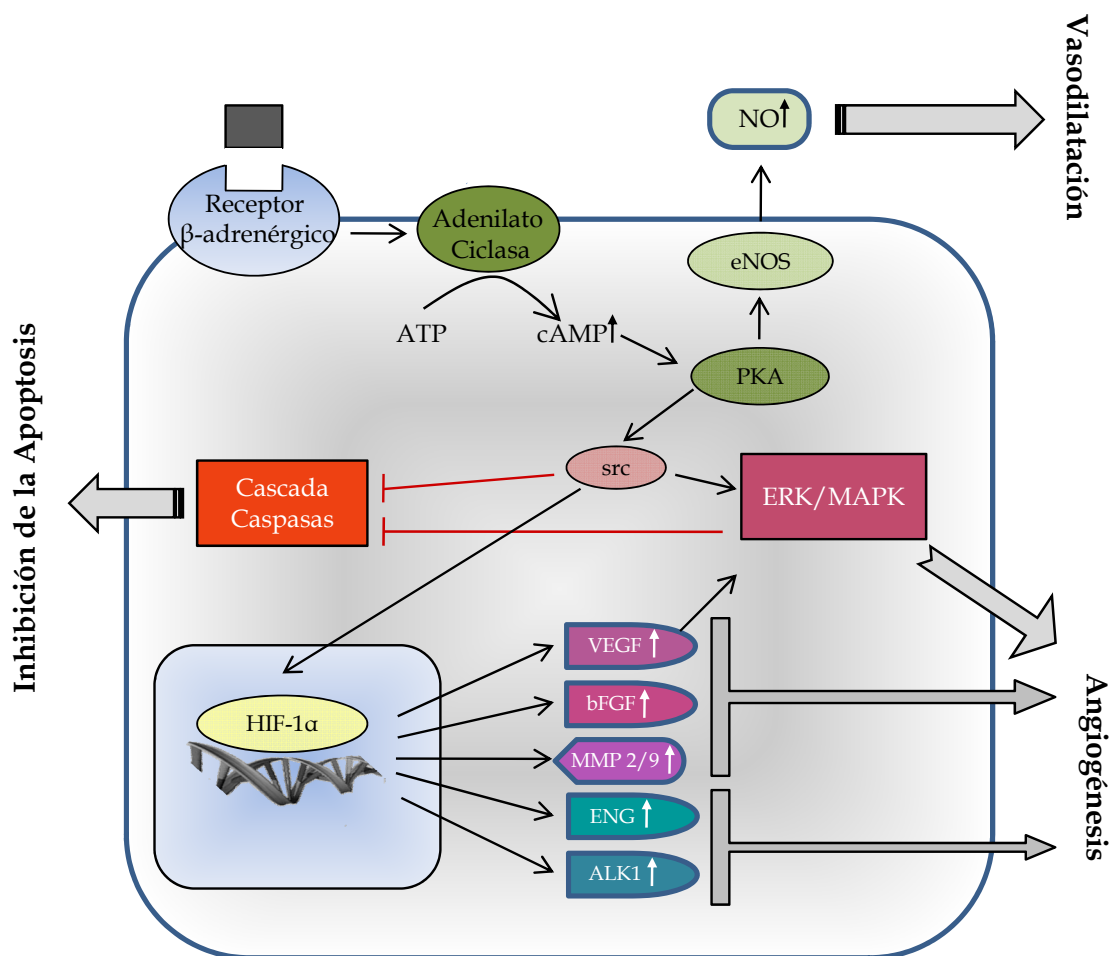


Figura 41. Procesos moleculares afectados por el Propranolol. Los β-adrenérgicos controlan el tono vascular, provocando la vasodilatación mediante la producción de NO, estimulan la síntesis de factores proangiogénicos como VEGF, bFGF, MMP, ENG o ALK1 y activa la expresión de las MAP quinasas, y también inhiben la ruta de apoptosis mediada por src/MAPK. Propranolol al bloquear este receptor, inhibiendo por tanto toda la señalización de esta ruta, provoca vasoconstricción, inhibe la angiogénesis y promueve apoptosis.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Objetivo 1: Estudio de células endoteliales tratadas con fármacos que puedan compensar la haploinsuficiencia de los genes ENG y ALK1.

- 1.1 El Raloxifeno, como ligando del receptor α de estrógenos, promueve el aumento de expresión de los genes *ENG* y *ALK1*, mediante cooperación del complejo Raloxifeno/ $ER\alpha$ y Sp1, aumentando la cantidad de ENG y ALK1 en la célula endotelial, y las funciones dependientes de estas proteínas, que explicarían a nivel clínico la disminución de las epistaxis en las mujeres postmenopáusicas tratadas en el hospital de Sierrallana. El tratamiento puede aumentar los niveles de algunos factores de coagulación, pudiendo provocar tromboembolismo, por lo que se recomienda un estudio de estos valores antes y durante el tratamiento.
- 1.2 El Estriol, metabolito del Estradiol, aumenta los niveles de expresión de ENG pero no los de ALK1. Estos efectos en células endoteliales serían independientes al engrosamiento de la pared de la mucosa nasal, efecto publicado en pacientes de HHT tratados tópicamente con pomadas de Estriol.
- 1.3 El antioxidante N-acetilcisteína aumenta los niveles de expresión de ENG y disminuye los de ALK1 en células endoteliales, justificando a nivel molecular la mejoría publicada por algunos autores, en pacientes HHT1 y no en HHT2, tratados con este antioxidante.
- 1.4 El inmunosupresor Tacrolimus, al secuestrar al inhibidor de ALK1, FKBP12, activa la señalización de TGF- β aumentando la expresión de ENG y ALK1, mejorando la angiogénesis y la migración de las células endoteliales. Se recomendaría el uso combinado de los inmunosupresores FK506/Sirolimus en episodios de trasplantes en pacientes HHT, ya que este último actuaría como antiangiogénico, disminuyendo los niveles de VEGF, elevados en pacientes de HHT, según las referencias publicadas.

Objetivo 2: Estudio de células endoteliales tratadas con fármacos antiangiogénicos como posibles candidatos para normalizar el exceso de la vasculatura anormal presente en la mucosa de estos pacientes.

- 2.1** La isoflavona Genisteína, disminuye la migración celular y la tubulogénesis, procesos inhibidos por los efectos antiangiogénicos de este fitoestrógeno sobre VEGF, pero también aumenta la expresión de ENG y ALK1, por lo que estaríamos ante un fármaco con un papel dual, y por tanto de potencial interés terapéutico en HHT.
- 2.2** El cumestano Resveratrol, disminuye, al igual que la Genisteína, la migración celular y la formación de tubos actuando sobre la ruta de VEGF, sin tener efecto sobre la expresión de ENG y ALK1. Podría utilizarse en HHT como antiangiogénico en terapia local para eliminar la vasculatura anormal.
- 2.3** El betabloqueante Propranolol, disminuye la angiogénesis debido a un efecto sinérgico de la inhibición de la expresión de VEGF (ya publicada), y a la disminución de los niveles de las proteínas proangiogénicas ENG y ALK1, efecto descrito por primera vez en esta tesis. Basándonos en estos resultados, se propone utilizar este antiangiogénico en aplicación tópica para disminuir la vasculatura defectuosa de la mucosa nasal en HHT.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla SA**, Cymerman U, Johnson RM, Deber CM y Letarte M. (2003). Disease-associated mutations in conserved residues of ALK-1 kinase domain. *Eur J Hum Genet* 11, 279-87.
- Abdalla SA**, Gallione CJ, Barst RJ, Horn EM, Knowles JA, Marchuk DA, Letarte M y Morse JH. (2004). Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J* 23, 373-7.
- Abdalla SA** y Letarte M. (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia, current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 43, 97-110.
- Abdalla SA**, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C y Letarte M. (2000). Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 9, 1227-37.
- Adam PJ**, Clesham GJ y Weissberg PL. (1998). Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 33-7.
- Adams RH** y Alitalo K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 464-78.
- Ades EW**, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC y Lawley TJ. (1992). HMEC-1, establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99, 683-90.
- Adomaityte J**, Farooq M y Qayyum R. (2008). Effect of raloxifene therapy on venous thromboembolism in postmenopausal women. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 99, 338-42.
- Aggarwal BB**, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S y Takada Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer, preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 24, 2783-840.
- Akiyama T**, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M y Fukami Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5.
- Albiñana V**, Bernabeu-Herrero ME, Zarrabeitia R, Bernabeu C y Botella LM. (2010). Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT), Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 103, 525-34.
- Albiñana V**, Sanz-Rodriguez F, Recio-Poveda L, Bernabeu C y Botella LM. (2011). Immunosuppressor FK506 increases endoglin and activin receptor-like kinase 1 expression and modulates transforming growth factor-beta1 signaling in endothelial cells. *Mol Pharmacol* 79, 833-43.
- Albiñana V**, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Bernabeu C y Botella LM. (2012). Propranolol as antiangiogenic candidate for the therapy of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Thromb Haemost* April 12 [Epub ahead of print].
- Alekel DL**, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW y Toda T. (2000). Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72, 844-52.

- Andersen PE**, Kjeldsen AD, Oxhøj H, Vase P y White RI, Jr. (1998). Embolotherapy for pulmonary arteriovenous malformations in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Acta Radiol* 39, 723-6.
- Anderson JW**, Johnstone B y Cook-Newell ME. (1995). Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333, 276-82.
- Annabi B**, Lachambre MP, Plouffe K, Moumdjian R y Beliveau R. (2009). Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol Res* 60, 438-45.
- Annichino-Bizzacchi JM**, Facchini RM, Torresan MZ y Arruda VR. (1999). Hereditary hemorrhagic telangiectasia response to aminocaproic acid treatment. *Thromb Res* 96, 73-6.
- Arbues J**, Escalante JM, Hernández JM y Cabrera T. (2005). Fitoestrógenos-isoflavonas- y menopausia. *Matronas Profesión* 6, 5-10.
- Arthur HM**, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J y Diamond AG. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217, 42-53.
- Asahara T**, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witztenbichler B, Schatteman G y Isner JM. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-7.
- Athar M**, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR y Kim AL. (2009). Multiple molecular targets of resveratrol, Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 486, 95-102.
- Athar M**, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR y Kim AL. (2007). Resveratrol, a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 224, 274-83.
- Azevedo GD**, Franco RF, Baggio MS, Maranhao TM, Ferriani RA y Silva de Sa MF. (2003). Effects of raloxifene therapy on the anticoagulant system in postmenopausal women. *Climacteric* 6, 140-5.
- Azevedo GD**, Franco RF, Baggio MS, Maranhao TM y Sa MF. (2005). Procoagulant state after raloxifene therapy in postmenopausal women. *Fertil Steril* 84, 1680-4.
- Barrett-Connor E**, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA y Wenger NK. (2006). Raloxifene Use for The Heart (RUTH) Trial Investigators. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 355, 125-37.
- Bayrak-Toydemir P**, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T, Tang W, Miller F y Mao R. (2006). A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet* 140, 2155-62.
- Bennetts HW**, Underwood EJ y Shier FL. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust Vet J* 22, 2-12.
- Bernabeu C**, Lopez-Novoa JM y Quintanilla M. (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1792, 954-73.
- Bjarnason NH**, Sarkar S, Duong T, Mitlak B, Delmas PD y Christiansen C. (2001). Six and twelve month changes in bone turnover are related to reduction in vertebral fracture risk during 3 years of raloxifene treatment in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 12, 922-30.
- Blanco FJ**, Santibañez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP y Bernabeu C. (2005). Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 204, 574-84.

- Blanco FJ**, Grande MT, Langa C, Oujó B, Velasco S, Rodríguez-Barbero A, Pérez-Gómez E, Quintanilla M, López-Novoa JM y Bernabeu C. (2008). S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 103,1383-92.
- Blobe GC**, Schiemann WP y Lodish HF. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342, 1350-8.
- Bobik A**. (2006). Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1712-20.
- Boehm JR**, Kutz SM, Sage EH, Staiano-Coico L y Higgins PJ. (1999). Growth state-dependent regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression during epithelial cell stimulation by serum and transforming growth factor-beta1. *J Cell Physiol* 181, 96-106
- Botella LM**, Sanchez-Elsner T, Rius C, Corbi A y Bernabeu C. (2001). Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem* 276, 34486-94.
- Botella LM**, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodríguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratzu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S y Bernabeu C. (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6, their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100, 4001-10.
- Boulet MJ**, Oddens BJ, Leher P, Vemer HM y Visser A. (1994). Climacteric and menopause in seven South-east Asian countries. *Maturitas* 19, 157-76.
- Bourdeau A**, Cymerman U, Paquet ME, Meschino W, McKinnon WC, Guttmacher AE, Becker L y Letarte M. (2000). Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Am J Pathol* 156, 911-23.
- Bourdeau A**, Dumont DJ y Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*. 1999; **104**, 1343-51.
- Bourdeau A**, Faughnan ME y Letarte M. (2000). Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med* 10, 279-85.
- Brakenhielm E**, Cao R y Cao Y. (2001). Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *Faseb J* 15, 1798-800.
- Cao Y**, Fu ZD, Wang F, Liu HY y Han R. (2005). Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants. *J Asian Nat Prod Res* 7, 205-13.
- Carmeliet P**. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-6.
- Carmeliet P y Jain RK**. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-57.
- Carmeliet P y Jain RK**. (2011). Molecular mechanism and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.
- Catalano S**, Rizza P, Gu G, Barone I, Giordano C, Marsico S, Casaburi I, Middea E, Lanzino M, Pellegrino M y Ando S. (2007). Fas ligand expression in TM4 Sertoli cells is enhanced by estradiol "in situ" production. *J Cell Physiol* 211, 448-56.
- Chang KJ**, Lee TT, Linares-Cruz G, Fournier S y de Lignieres B. (1995). Influences of percutaneous administration of estradiol and progesterone on human breast epithelial cell cycle in vivo. *Fertil Steril* 63, 785-91.
- Cheifetz S**, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J y Letarte M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267, 19027-30.
- Cheskis BJ**, Greger JG, Nagpal S y Freedman LP. (2007). Signaling by estrogens. *J Cell Physiol* 213, 610-7.

- Cirulli A**, Liso A, D'Ovidio F, Mestice A, Pasculli G, Gallitelli M, Rizzi R, Specchia G y Sabbà C. (2003). Vascular endothelial growth factor serum levels are elevated in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Acta Haematol* 110, 29-32.
- Cleaver O y Melton DA**. (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med* 9, 661-8.
- Clement MV**, Hirpara JL, Chawdhury SH y Pervaiz S. (1998). Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 92, 996-1002.
- Cole SG**, Begbie ME, Wallace GM y Shovlin CL. (2005). A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 42, 577-82.
- Creidi P**, Faivre B, Agache P, Richard E, Haudiquet V y Sauvanet JP. (1994). Effect of a conjugated oestrogen (Premarin) cream on ageing facial skin. A comparative study with a placebo cream. *Maturitas* 19, 211-23.
- Cummings SR**, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A y Jordan VC. (1999). The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women, results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* 281, 2189-97.
- Dalais FS**, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R y Strauss BJ. (1998). Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. *Climacteric* 1, 124-9.
- David L**, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ y Bailly S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 109, 1953-61.
- de Gussem EM**, Snijder RJ, Disch FJ, Zanen P, Westermann CJ y Mager JJ. (2009). The effect of N-acetylcysteine on epistaxis and quality of life in patients with HHT, a pilot study. *Rhinology* 47, 85-8.
- Delmas PD**, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M y Christiansen C. (1997). Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 337, 1641-7.
- Dennler S**, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, y Gauthier JM. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17, 3091-100.
- Derynck R y Zhang YE**. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-84.
- di Clemente N, Belville C**. (2006). Anti-Mullerian hormone receptor defect. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 599-610.
- Dong C**, Li Z, Alvarez R, Jr., Feng XH y Goldschmidt-Clermont PJ. (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell* 5, 27-34.
- Drake CJ**. (2003). Embryonic and Adult Vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 73-82.
- El-Ghazzawi IF**, Mandour MA, Aziz MT y El-Heneidy AR. (1979). Changes in the lower respiratory epithelia induced by oestrogen intake. An experimental histopathological study. *J Laryngol Otol* 93, 601-12.
- El-Rayes BF**, Ali S, Ali IF, Philip PA, Abbruzzese J y Sarkar FH. (2006). Potentiation of the effect of erlotinib by genistein in pancreatic cancer, the role of Akt and nuclear factor-kappaB. *Cancer Res* 66, 10553-9.
- Emmerson E**, Campbell L, Ashcroft GS y Hardman MJ. (2010). The phytoestrogen genistein promotes wound healing by multiple independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* 321, 184-93.

- Ettinger B**, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Gluer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P y Cummings SR. (1999). Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene, results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *Jama* 282, 637-45.
- Faughnan ME**, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, Spears J, Brown DH, Buscarini E, Chesnutt MS, Cottin V, Ganguly A, Gossage JR, Guttmacher AE, Hyland RH, Kennedy SJ, Korzenik J, Mager JJ, Ozanne AP, Piccirillo JF, Picus D, Plauchu H, Porteous ME, Pyeritz RE, Ross DA, Sabba C, Swanson K, Terry P, Wallace MC, Westermann CJ, White RI, Young LH y Zarrabeitia R. (2011). International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 48, 73-87.
- Fernandez-L A**, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, Pericacho M, Rodriguez-Barbero A, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Duwell A, Vega MA, Bernabeu C y Botella LM. (2007a). Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mol Genet* 16, 1515-33.
- Fernandez-L A**, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, Ramirez JR, Morales-Angulo C, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Bernabeu C y Botella LM. (2007b). Therapeutic action of tranexamic acid in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT), regulation of ALK-1/endoglin pathway in endothelial cells. *Thromb Haemost* 97, 254-62.
- Fernandez-L A**, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Morales C, Restrepo CM, Ramirez JR, Coto E, Lenato GM, Bernabeu C y Botella LM. (2006). Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat* 27, 295.
- Fernandez-Ruiz E**, St-Jacques S, Bellon T, Letarte M y Bernabeu C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet* 64, 204-7.
- Fiorella ML**, Ross DA, White RI, Sabba C y Fiorella R. (2004). Hereditary haemorrhagic telangiectasia, state of the art. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 24, 330-6.
- Fodstad P**, Dheyauldeen S, Rinde M y Bachmann-Harildstad G. (2011). Anti-VEGF with 3-week intervals is effective on anemia in a patient with severe hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Ann Hematol* 90, 611-2.
- Fonsatti E**, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG y Maio M. (2003). Endoglin (CD105), a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 22, 6557-63.
- Fotsis T**, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R y Schweigerer L. (1995). Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 125, 790S-7S.
- Fotsis T**, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wahala K, Montesano R y Schweigerer L. (1997). Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 57, 2916-21.
- Fulbright RK**, Chaloupka JC, Putman CM, Sze GK, Merriam MM, Lee GK, Fayad PB, Awad IA y White RI, Jr. (1998). MR of hereditary hemorrhagic telangiectasia, prevalence and spectrum of cerebrovascular malformations. *Ajnr* 19, 477-84.

- Gacche RN**, Shegokar HD, Gond DS, Yang Z y Jadhav AD. (2011). Evaluation of selected flavonoids as antiangiogenic, anticancer, and radical scavenging agents, an experimental and in silico analysis. *Cell Biochem Biophys* 61, 651-63.
- Galat A**. (2011). Common structural traits for cystine knot domain of the TGF β superfamily of proteins and three-fingered ectodomain of their cellular receptors. *Cell Mol Life Sci* 68, 3437-3451.
- Gallione CJ**, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, Mitchell G, Drouin E, Westermann CJ y Marchuk DA. (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* 363, 852-9.
- Gallione CJ**, Richards JA, Letteboer TG, Rushlow D, Prigoda NL, Leedom TP, Ganguly A, Castells A, Ploos van Amstel JK, Westermann CJ, Pyeritz RE y Marchuk DA. (2006). SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet* 43, 793-7.
- Garrido-Martin EM**, Blanco FJ, Fernandez-L A, Langa C, Vary CP, Lee UE, Friedman SL, Botella LM y Bernabeu C. (2010). Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol* 11, 51.
- Ghosh K y Ghosh K**. (2008). Hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT), negotiating between the Scylla of bleeding and Charybdis of thrombosis. *Thromb Haemost* 100, 162-4.
- Gialeli C**, Theocharis AD y Karamanos NK. (2010). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278, 16-27.
- Giordano A**, Romano S, Mallardo M, D'Angelillo A, Cali G, Corcione N, Ferraro P y Romano MF. (2008). FK506 can activate transforming growth factor-beta signalling in vascular smooth muscle cells and promote proliferation. *Cardiovasc Res* 79, 519-26.
- Giordano P**, Lenato GM, Pierucci P, Suppressa P, Altomare M, Del Vecchio G, Di Bitonto G, De Mattia D, Guanti G y Sabbà C. (2009). Effects of VEGF on phenotypic severity in children with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Pediatr Hematol Oncol* 31, 577-82.
- Goligorsky MS**. (2000). Making sense out of oxygen sensor. *Circ Res* 86, 824-6.
- Gougos A y Letarte M**. (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265, 8361-4.
- Goumans MJ**, Lebrin F y Valdimarsdottir G. (2003a). Controlling the angiogenic switch, a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 13, 301-7.
- Goumans MJ**, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S y ten Dijke P. (2003b). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell* 12, 817-28.
- Goumans MJ**, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P y ten Dijke P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J* 21, 1743-53.
- Govinden R y Bhoola KD**. (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 98, 257-65.
- Gresele P**, Momi S y Miglicci R. (2010). Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost* 103, 56-61.
- Guba M**, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW y Geissler EK. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis, involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8, 128-35.
- Guerrero-Esteo M**, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA, Fabra A, Garcia-Pardo A, Vera S, Letarte M y Bernabeu C. (1999). Endoglin overexpression

- modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 78, 614-23.
- Guerrero-Esteo M**, Sanchez-Elsner T, Letamendia A y Bernabeu C. (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277, 29197-209.
- Guttmacher AE**, Marchuk DA y White RI, Jr. (1995). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 333, 918-24.
- Hanes FM**. (1909). Multiple hereditary telangiectases causing hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Johns Hopkins Hospital Bulletin* 20, 63-73.
- Hardman MJ**, Emmerson E, Campbell L y Ashcroft GS. (2008). Selective estrogen receptor modulators accelerate cutaneous wound healing in ovariectomized female mice. *Endocrinology* 149, 551-7.
- Hawinkels LJ**, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF y ten Dijke P. (2010). Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70, 4141-50.
- Heldin CH**, Miyazono K y ten Dijke P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-71.
- Henry-Berger J**, Mouzat K, Baron S, Bernabeu C, Marceau G, Saru JP, Sapin V, Lobaccaro JM y Caira F. (2008). Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod* 78, 968-75.
- Hoak JC**, Warner ED, Cheng HF, Fry GL y Hankenson RR. (1971). Hemangioma with thrombocytopenia and microangiopathic anemia (Kasabach-Merritt syndrome), an animal model. *J Lab Clin Med* 77, 941-50.
- Hu Y**, Sun CY, Huang J, Hong L, Zhang L y Chu ZB. (2007). Antimyeloma effects of resveratrol through inhibition of angiogenesis. *Chinese Med J (Engl)* 120, 1672-7.
- Ichimura K**, Tanaka H, Yamamoto Y y Nakamura K. (2006). Nasal dermoplasty for Japanese hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Auris Nasus Larynx* 33, 423-8.
- Itoh S y ten Dijke P**. (2007). Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 19, 176-84.
- Jameson JJ y Cave DR**. (2004). Hormonal and antihormonal therapy for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 114, 705-9.
- Jerkic M**, Rivas-Elena JV, Prieto M, Carron R, Sanz-Rodriguez F, Perez-Barriocanal F, Rodriguez-Barbero A, Bernabeu C y Lopez-Novoa JM. (2004). Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb J* 18, 609-11.
- Johnson DW**, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME y Marchuk DA. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13, 189-95.
- Johnson DW**, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Porteous ME y Marchuk DA. (1995). A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome research* 5, 21-8.
- Jones N**, Iljin K, Dumont DJ y Alitalo K. (2001). Tie receptors, new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 257-67.
- Jordan ML**, Naraghi R, Shapiro R, Smith D, Vivas CA, Scantlebury VP, Gritsch HA, McCauley J, Randhawa P, Demetris AJ, McMichael J, Fung JJ y Starzl TE. (1997). Tacrolimus rescue therapy for renal allograft rejection--five-year experience. *Transplantation* 63, 223-8.
- Kim YA**, Lee WH, Choi TH, Rhee SH, Park KY y Choi YH. (2003a). Involvement of p21WAF1/CIP1, pRB, Bax and NF-kappaB in induction of growth arrest and apoptosis by resveratrol in human lung carcinoma A549 cells. *Int J Oncol* 23, 1143-9.

- Kim YA**, Rhee SH, Park KY y Choi YH. (2003b). Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food* 6, 273-80.
- Kjeldsen AD y Kjeldsen J.** (2000). Gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol* 95,415-8.
- Kjeldsen AD**, Vase P y Green A. (1999). Hereditary haemorrhagic telangiectasia, a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Int Med* 245, 31-9.
- Klagsbrun M y D'Amore PA.** (1991). Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53,217-39.
- Knight DC y Eden JA.** (1996). A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol* 87, 897-904.
- Korchynskyi O y ten Dijke P.** (2002). Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277, 4883-91.
- Kraft TE**, Parisotto D, Schempp C y Efferth T. (2009). Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49, 782-99.
- Kuiper GG**, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B y Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-63.
- Kundu JK**, Shin YK, Kim SH y Surh YJ. (2006). Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF-kappaB in mouse skin by blocking IkappaB kinase activity. *Carcinogenesis* 27, 1465-74.
- Kunsch C y Medford RM.** (1999). Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 85, 753-66.
- Kwaan HC y Silverman S.** (1973). Fibrinolytic activity in lesions of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Dermatol* 107, 571-3.
- Lamy S**, Lachambre MP, Lord-Dufour S y Beliveau R. (2010). Propranolol suppresses angiogenesis in vitro, inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vasc Pharmacol* 53, 200-8.
- Larson AM.** (2003). Liver disease in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Gastroenterol* 36, 149-58.
- Laschke MW**, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B y Menger MD. (2006). Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149, 137-44.
- Lastella P**, Sabba C, Lenato GM, Resta N, Lattanzi W, Gallitelli M, Cirulli A y Guanti G. (2003). Endoglin gene mutations and polymorphisms in Italian patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet* 63, 536-40.
- Lastres P**, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M y Bernabeu C. (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22, 393-7.
- Lastres P**, Martin-Perez J, Langa C y Bernabeu C. (1994). Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* 301, 765-8.
- Leaute-Labreze C**, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB y Taieb A. (2008). Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 358, 2649-51.
- Lebrin F**, Deckers M, Bertolino P y Ten Dijke P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 65, 599-608.
- Lebrin F**, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM y ten Dijke P. (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23, 4018-28.
- Lebrin F**, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, Breant C, Mathivet T, Larrivee B, Thomas JL, Arthur HM, Westermann CJ, Disch F, Mager JJ, Snijder RJ,

- Eichmann A y Mummery CL. (2010). Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med* 16, 420-8.
- Lesca G**, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, Riviere S, Leheup B, Goizet C, Carette MF, Cordier JF, Pinson S, Soubrier F, Calender A y Giraud S. (2004). Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat* 23, 289-99.
- Letamendia A**, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L y Bernabeu C. (1998). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 273, 33011-9.
- Letteboer TG**, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, Lindhout D, Hennekam FA, Westermann CJ y Ploos van Amstel JK. (2005). Hereditary hemorrhagic telangiectasia, ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet* 116, 8-16.
- Li C**, Guo B, Ding S, Rius C, Langa C, Kumar P, Bernabeu C y Kumar S. (2003). TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells, a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res* 23, 1189-96.
- Li C**, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N y Kumar S. (2000). Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 89, 122-6.
- Li DY**, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB y Wendel DP. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-7.
- Li N y Karin M.** (1999). Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J* 13, 1137-43.
- Li Y y Sarkar FH.** (2002). Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res* 8, 2369-77.
- Llorca O**, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol* 365, 694-705.
- Lopez-Casillas F**, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS y Massague J. (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67, 785-95.
- Lopez-Novoa JM y Bernabeu C.** (2010). The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol* 299, H959-74.
- Lund VJ y Howard DJ.** (1999). A treatment algorithm for the management of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Rhinol* 13, 319-22.
- Lux A**, Salway F, Dressman HK, Kroner-Lux G, Hafner M, Day PJ, Marchuk DA y Garland J. (2006). ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF-beta and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovasc Disord* 6, 13.
- Ma X**, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M y O'Brien E. (2000). Endoglin is overexpressed after arterial injury and is required for transforming growth factor-beta-induced inhibition of smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2546-52.
- Maher CO**, Piepgras DG, Brown RD, Jr., Friedman JA y Pollock BE. (2001). Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke* 32, 877-82.
- Mahmoud M**, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttiger M y Arthur HM. (2010). Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res* 106, 1425-33.
- Marchuk DA.** (1998). Genetic abnormalities in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Opin Hematol* 5, 332-8.

- Massague J.** (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-91.
- Massague J, Seoane J y Wotton D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-810.
- Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C y Letarte M.** (2000). Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke* 31, 2653-60.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, McCormick MK, Pericak-Vance MA, Heutink P, Oostra BA, Haitjema T, Westerman CJJ, Porteous ME, Guttmacher AE, Letarte M y Marchuk DA.** (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8, 345-51.
- McCawley LJ y Matrisian LM.** (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Curr Opin Cell Biol* 13, 534-40.
- McDonald MT, Papenberg KA, Ghosh S, Glatfelter AA, Biesecker BB, Helmbold EA, Markel DS, Zolotor A, McKinnon WC, Vanderstoep JL, Jackson CE, Iannuzzi M, Collins FS, Boehnke M, Porteous ME, Guttmacher AE y Marchuk DA.** (1994). A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet* 6, 197-204.
- Meulmeester E y ten Dijke P.** (2010). Integration of transcriptional signals at the tumor cell invasive front. *Cell Cycle* 9, 2499-500.
- Miyazono K, Kamiya Y y Morikawa M.** (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147, 35-51.
- Morales-Angulo C, Perez del Molino A, Zarrabeitia R, Fernandez A, Sanz-Rodriguez F y Botella LM.** (2007). Treatment of epistaxes in hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease) with tranexamic acid. *Acta Otorrinolaringol Esp* 58, 129-32.
- Mosca L, Grady D, Barrett-Connor E, Collins P, Wenger N, Abramson BL, Paganini-Hill A, Geiger MJ, Dowsett SA, Amewou-Atisso M y Kornitzer M.** (2009). Effect of raloxifene on stroke and venous thromboembolism according to subgroups in postmenopausal women at increased risk of coronary heart disease. *Stroke* 40, 147-55.
- Moussouttas M, Fayad P, Rosenblatt M, Hashimoto M, Pollak J, Henderson K, Ma TY y White RI.** (2000). Pulmonary arteriovenous malformations, cerebral ischemia and neurologic manifestations. *Neurology*. 55, 959-64.
- Moustakas A y Heldin CH.** (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573-84.
- Mu Y, Gudey SK y Landstrom M.** (2011). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347, 11-20.
- Murkies AL, Wilcox G y Davis SR.** (1998). Clinical review 92, Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 297-303.
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K y Imaizumi T.** (2000). Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105, 1527-36.
- Nakashima S, Koike T y Nozawa Y.** (1991). Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A2-mediated human platelet responses. *Mol Pharmacol* 39, 475-80.
- Narayanan BA, Narayanan NK, Re GG y Nixon DW.** (2003). Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells, P53-mediated molecular targets. *Int J Cancer* 104, 204-12.
- Navarro Moll MC.** (2005). Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecol Obstet Clin* 6, 159-165.
- Noriega-Reyes Y y Langley E.** Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cancer mamario. *Cancerología*, 2008; 3, 29-40

- O'Connell PJ**, McKenzie A, Fisicaro N, Rockman SP, Pearse MJ y d'Apice AJ. (1992). Endoglin, a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 90, 154-9.
- Oh SP**, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S y Li E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2626-31.
- Olitsky SE**. (2011). Topical timolol for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Otolaryngol* Nov 11. [Epub ahead of print]
- Olivieri C**, Mira E, Delu G, Pagella F, Zambelli A, Malvezzi L, Buscarini E y Danesino C. (2002). Identification of 13 new mutations in the ACVRL1 gene in a group of 52 unselected Italian patients affected by hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 39, E39.
- Osler W**. (1901) On a family form of recurring epistaxis, associated with multiple telangiectases of the skin and mucous membranes. *Johns Hopkins Hospital Bulletin* 12,333-7.
- Ota T**, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H y Miyazono K. (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 193, 299-318.
- Paech K**, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ y Scanlan TS. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277, 1508-10.
- Pardali E**, Goumans MJ y ten Dijke P. (2010). Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* 20, 556-67.
- Park E**, Lee SM, Jung IK, Lim Y y Kim JH. (2011). Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 514-9.
- Park SO**, Wankhede M, Lee YJ, Choi EJ, Fliess N, Choe SW, Oh SH, Walter G, Raizada MK, Sorg BS y Oh SP. (2009). Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 119, 3487-96.
- Patel-Hett S** y D'Amore PA. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55, 353-63.
- Pepper MS**. (1997). Transforming growth factor-beta, vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 21-43.
- Peracchia F**, Polentarutti N, Colotta F y Mussoni L. (1989). Increased expression of urokinase mRNA in bovine aortic endothelial cells treated with propranolol. *Biochem Biophys Res Commun* 160, 977-81.
- Perez LJ**. (2004). Metalloproteinases and the skin. *Actas Dermosifiliogr* 95, 413-23
- Perez-Gomez E**, Del Castillo G, Juan Francisco S, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C y Quintanilla M. (2010). The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal*. 10, 2367-84.
- Perez-Gomez E**, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabeu C y Quintanilla M. (2005). Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 24, 4450-61.
- Pichuantes S**, Vera S, Bourdeau A, Pece N, Kumar S, Wayner EA y Letarte M. (1997). Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. *Tissue Antigens* 50, 265-76.
- Plauchu H**, de Chadarevian JP, Bideau A y Robert JM. (1989). Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 32, 291-7.
- Qu R**, Silver MM y Letarte M. (1998). Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res* 292, 333-43.

- Rendu H.** (1896). Epistaxis repetees chez un sujet porteur de petits angiomes cutanes et muqueux. *Lancette française: Gazette des Hopitaux Civils et Militaires* 135,1322-3.
- Reyes-Mujica M,** Lopez-Corella E, Perez-Fernandez L, Cuevas-Schacht F y Carrillo-Farga J. (1988). Osler-Weber-Rendu disease in an infant. *Hum Pathol* 19, 1243-6.
- Risau W.** (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-4.
- Rius C,** Smith JD, Almendro N, Langa C, Botella LM, Marchuk DA, Vary CP y Bernabeu C. (1998). Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 92, 4677-90.
- Roberts AB y Sporn MB.** Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 1993; 8, 1-9.
- Runowicz CD,** Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Ford LG, Vogel VG y Wolmark N. (2011). Gynecologic conditions in participants in the NSABP breast cancer prevention study of tamoxifen and raloxifene (STAR). *Am J Obstet Gynecol* 205, 535 e1-5.
- Saba HI,** Morelli GA y Logrono LA. (1994). Brief report, treatment of bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia with aminocaproic acid. *N Engl J Med* 330, 1789-90.
- Sabba C,** Gallitelli M y Palasciano G. (2001). Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 345, 926.
- Sadick H,** Bergler WF, Oulmi-Kagermann J, Naim R, Sadick M, Hormann K y Riedel F. (2005). Estriol induced squamous metaplasia on the nasal mucosa in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Med Res* 36, 468-73.
- Sadick H,** Naim R, Oulmi J, Hormann K y Bergler W. (2003). Plasma surgery and topical estriol, effects on the nasal mucosa and long-term results in patients with Osler's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 233-8.
- Sanchez Perez RS,** Mora PC, Rodriguez JD, Sanchez FR y de Torres JL. (2009). Treatment of infantile hemangioma with propranolol. *An Pediatr* 72, 152-4.
- Sanchez-Carpintero I,** Ruiz-Rodriguez R y Lopez-Gutierrez JC. (2011). Propranolol in the treatment of infantile hemangioma, clinical effectiveness, risks, and recommendations. *Actas dermosifiliogr* 102, 766-79.
- Sanchez-Elsner T,** Botella LM, Velasco B, Langa C y Bernabeu C. (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 277, 43799-808.
- Santibañez JF,** Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, Lopez-Novoa JM, Attisano L y Bernabeu C. (2007). Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 210, 456-68.
- Santibañez JF,** Quintanilla M y Bernabeu C. (2011). TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 121, 233-51.
- Sanz-Rodriguez F,** Fernandez-L A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, Bernabeu C y Botella LM. (2004a). Mutation analysis in Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia, deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. *Clin Chem* 50, 2003-11.
- Sanz-Rodriguez F,** Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP y Bernabeu C. (2004b). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 279, 32858-68.
- Sasakawa T,** Sasakawa Y, Masunaga T, Fujitsu T, Hirayama Y, Ohkubo Y y Mutoh S. (2005). FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor alpha secretion from peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 29, 67-71.

- Scafonas A**, Reszka AA, Kimmel DB, Hou XS, Su Q, Birzin ET, Kim S, Chen HY, Tan Q, Roher SP, Dinunno F, Hammond ML, Rodan GA, Towler DA y Schmidt A. (2008). Agonist-like SERM effects on ERalpha-mediated repression of MMP1 promoter activity predict in vivo effects on bone and uterus. *J Steroid Biochem mol Biol* 110, 197-206.
- Schaffer M**, Schier R, Napirei M, Michalski S, Traska T y Viebahn R. (2007). Sirolimus impairs wound healing. *Langenbeck's Arch Surg* 392, 297-303.
- Scharpfenecker M**, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Lowik CW y ten Dijke P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* 120, 964-72.
- Schmierer B y Hill CS**. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction, molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev* 8, 970-82.
- Seki T**, Hong KH y Oh SP. (2006). Non overlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* 86, 116-29.
- Seki T**, Yun J y Oh SP. (2003). Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res* 93, 682-9.
- Shang Y y Brown M**. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295, 2465-8.
- Shi Q**, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 362-7.
- Shi Y y Massague J**. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shi Y**, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J y Pavletich NP. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA, insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585-94.
- Shovlin CL**. (1997). Molecular defects in rare bleeding disorders, hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost* 78, 145-50.
- Shovlin CL**. (2010). Hereditary haemorrhagic telangiectasia, pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* 24, 203-19.
- Shovlin CL**, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD y Plauchu H. (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 91, 66-7.
- Shovlin CL**, Hughes JM, Tuddenham EG, Temperley I, Perembelon YF, Scott J, Seidman CE y Seidman JG. (1994). A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nat Genet* 6, 205-9.
- Shovlin CL y Letarte M**. (1999). Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations, issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax* 54, 714-29.
- Shovlin CL**, Sulaiman NL, Govani FS, Jackson JE y Begbie ME. (2007). Elevated factor VIII in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT), association with venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 98, 1031-9.
- Skaro AI**, Marotta PJ y McAlister VC. (2006). Regression of cutaneous and gastrointestinal telangiectasia with sirolimus and aspirin in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Ann Int Med* 144, 226-7.
- Smoliga JM**, Baur JA, Hausenblas HA. (2011). Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 55, 1129-41.
- Sommers Smith SK y Smith DM**. (2002). Beta blockade induces apoptosis in cultured capillary endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38, 298-304.

- Song J**, Oh SP, Schrewe H, Nomura M, Lei H, Okano M, Gridley T y Li E. (1999). The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev Biol* 213, 157-69.
- Stenvers KL y Findlay JK**. (2010). Inhibins, from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends Endocrinol Metab* 21, 174-80.
- Storch CH y Hoeger PH**. (2010). Propranolol for infantile haemangiomas, insights into the molecular mechanisms of action. *Br J Dermatol* 163, 269-74.
- Sun CY**, Hu Y, Guo T, Wang HF, Zhang XP, He WJ y Tan H. (2006). Resveratrol as a novel agent for treatment of multiple myeloma with matrix metalloproteinase inhibitory activity. *Acta Pharmacol Sin* 27, 1447-52.
- Suppressa P**, Liso A y Sabbà C. (2011). Low dose intravenous bevacizumab for the treatment of anaemia in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Br J Haematol* 152, 365.
- Sutton, H. G.** (1864). Epistaxis as an indication of impaired nutrition, and of degeneration of the vascular system. *Medical Mirror* 1, 769-781.
- Ten Dijke P y Arthur HM**. (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev* 8, 857-69.
- Ten Dijke P**, Goumans MJ y Pardali E. (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11, 79-89.
- Ten Dijke P**, Korchynskyi O, Valdimarsdottir G, Goumans MJ. (2003). Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Mol Cell Endocrinol* 211, 105-13.
- Toporsian M**, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, Husain M y Letarte M. (2005). A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res* 96, 684-92.
- Tournay, O. y Benezra, R.** (1996). Transcription of the dominant-negative helix-loop-helix protein Id1 is regulated by a protein complex containing the immediate-early response gene Egr-1. *Mol Cell Biol* 16, 2418-30.
- Tse D y Stan RV**. (2010). Morphological heterogeneity of endothelium. *Semin Thromb Hemost* 36, 236-45.
- Udina E y Navarro X**. (2002). Immunophilins, neuroprotective agents and promoters of neural regeneration. *Neurología* 17, 200-13.
- Valdimarsdottir G**, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH y ten Dijke P. (2006). Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol* 7, 16.
- Van Meeteren LA y Ten Dijke P**. (2011). Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res* 347, 177-86.
- Van Zonneveld AJ**, Curriden SA y Loskutoff DJ. 1988 Type 1 plasminogen activator inhibitor gene, functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5525-9.
- Vang O**, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, Das DK, Delmas D, Gottfried C, Lin HY, Ma QY, Mukhopadhyay P, Nalini N, Pezzuto JM, Richard T, Shukla Y, Surh YJ, Szekeres T, Szkudelski T, Walle T y Wu JM. (2011). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PloS one* 6, e19881.
- Varila E**, Rantala I, Oikarinen A, Risteli J, Reunala T, Oksanen H y Punnonen R. (1995). The effect of topical oestradiol on skin collagen of postmenopausal women. *Br J Obstet Gynaecol* 102, 985-9.
- Vase I y Vase P**. (1979). Ocular lesions in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Acta ophthalmol* 57, 1084-90.

- Vincent P**, Plauchu H, Hazan J, Faure S, Weissenbach J y Godet J. (1995). A third locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12q. *Hum Mol Genet* 4, 945-9.
- Wang H**, Yang YJ, Qian HY, Zhang Q, Xu H y Li JJ. (2011). Resveratrol in cardiovascular disease, what is known from current research? *Heart Fail Rev* [Epub ahead of print]
- Wang H**, Zhou H, Zou Y, Liu Q, Guo C, Gao G, Shao C y Gong Y. (2010). Resveratrol modulates angiogenesis through the GSK3beta/beta-catenin/TCF-dependent pathway in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 80, 1386-95.
- Wang JM**, Kumar S, van Agthoven A, Kumar P, Pye D y Hunter RD. (1995) Irradiation induces up-regulation of E9 protein (CD105) in human vascular endothelial cells. *Int J Cancer*. 62, 791-6.
- Webb P**, Lopez GN, Uht RM y Kushner PJ. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway, potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9, 443-56.
- Weber F**. (1907). Multiple hereditary developmental angiomas (telangiectases) of the skin and mucous membranes associated with recurring haemorrhages. *Lancet* 2, 160-2.
- Wiederrecht GJ**, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ y Abraham RT. (1995). Mechanism of action of rapamycin, new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res*. 1,53-71.
- Wieser R**, Wrana JL y Massague J. (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* 14, 2199-208.
- Wotton D y Massague J**. (2001). Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 254, 145-64.
- Yamashita H**, ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K y Heldin CH. (1994). Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269, 20172-8.
- Yancopoulos GD**, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ y Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-8.
- Yano O**, Kanellopoulos J, Kieran M, Le Bail O, Israël A y Kourilsky P. (1987). Purification of KBF1, a common factor binding to both H-2 and beta 2-microglobulin enhancers. *EMBO J* 6, 3317-24.
- Yu X**, Zhu J, Mi M, Chen W, Pan Q y Wei M. (2012). Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Med Oncol* 29, 349-57.
- Zacharski LR**, Dunbar SD y Newsom WA, Jr. (2001). Hemostatic effects of tamoxifen in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost* 85, 371-2.
- Zarrabeitia R**, Albinana V, Salcedo M, Senaris-Gonzalez B, Fernandez-Forcelledo JL y Botella LM. (2010). A review on clinical management and pharmacological therapy on hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT). *Curr Vasc Pharmacol* 8, 473-81.
- Zawel L**, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B y Kern SE. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1, 611-7.
- Zhang YE**. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 19, 128-39.
- Zhao C**, Dahlman-Wright K y Gustafsson JA. (2010). Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. *J Biol Chem* 285, 39575-9.

ANEXOS

Parte del trabajo incluido en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Albiñana V**, Bernabeu-Herrero ME, Zarrabeitia R, Bernabeu C, Botella LM. (2010) Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells. *Thromb Haemost*; 103, 525-34.
- **Albiñana V**, Sanz-Rodriguez F, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM. (2011). Immunosuppressor FK506 increases endoglin and activin receptor-like kinase 1 expression and modulates transforming growth factor-beta1 signaling in endothelial cells. *Mol Pharm*; 79, 833-43.
- **Albiñana V**, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Bernabeu C y Botella LM. (2012). Propranolol as antiangiogenic candidate for the therapy of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Thromb Haemost* 2012 April 1 [Epub ahead of print]

Además, durante la realización de esta Tesis Doctoral se ha colaborado en las siguientes publicaciones:

- Fontalba A, Fernandez-L A, García-Alegría E, **Albiñana V**, Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Bernabeu-Herrero ME, Ojeda ML, Fernandez-Luna JL, Bernabeu C y Botella LM. (2008) Mutation study of Spanish patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *BMC Med Genet*; 9, 75
- Zarrabeitia R, **Albiñana V**, Salcedo M, Senaris-Gonzalez B, Fernandez-Forcelledo JL, Botella LM. (2010) A review on clinical management and pharmacological therapy on Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT). *Curr Vasc Pharm*; 8, 473-81.

Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells

Virginia Albiñana^{1,2}; Maria E. Bernabeu-Herrero^{1,4}; Roberto Zarrabeitia^{2,3}; Carmelo Bernabeu^{1,2}; Luisa M. Botella^{1,2}

¹Centro de Investigaciones Biológicas, Spanish Research Council (CSIC), Madrid, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain; ³Spanish HHT Unit, Hospital de Sierrallana. Torrelavega, Santander, Spain; ⁴Present address: Siemens S.A., Sector Healthcare, Getafe, Spain

Summary

Hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler-Weber syndrome, is an autosomal dominant vascular disease. The clinical manifestations are epistaxis, mucocutaneous and gastrointestinal telangiectases, and arteriovenous malformations. There are two predominant types of HHT caused by mutations in *Endoglin* (*ENG*) and activin receptor-like kinase 1 (*ALK1*) (*ACVRL1*) genes, HHT1 and HHT2, respectively. No cure for HHT has been found and there is a current need to find new effective drug treatments for the disease. Some patients show severe epistaxis which interferes with their quality of life. We report preliminary results obtained with Raloxifene to treat epistaxis in postmenopausal HHT women diagnosed with osteoporosis. We tried to unravel the molecular mechanisms involved in the therapeutic effects of raloxifene. *ENG* and *ACVRL1* genes code for proteins involved in the transforming growth factor β pathway and it is widely accepted that haploinsufficiency is the ori-

gin for the pathogenicity of HHT. Therefore, identification of drugs able to increase the expression of those genes is essential to propose new therapies for HHT. *In vitro* results show that raloxifene increases the protein and mRNA expression of *ENG* and *ALK1* in cultured endothelial cells. Raloxifene also stimulates the promoter activity of these genes, suggesting a transcriptional regulation of *ENG* and *ALK1*. Furthermore, Raloxifene improved endothelial cell functions like tubulogenesis and migration in agreement with the reported functional roles of Endoglin and ALK1. Our pilot study provides a further hint that oral administration of raloxifene may be beneficial for epistaxis treatment in HHT menopausal women. The molecular mechanisms of raloxifene involve counteracting the haploinsufficiency of *ENG* and *ALK1*.

Keywords

HHT, Endoglin, ALK1, epistaxis, raloxifene

Correspondence to:

Luisa María Botella
Centro de Investigaciones Biológicas CIB, CSIC
Ramiro de Maeztu, 9
28040 Madrid, Spain
E-mail: cibluisa@cib.csic.es

Received: July 3, 2009

Accepted after minor revision: November 22, 2009

Prepublished online: February 2, 2010

doi:10.1160/TH09-07-0425

Thromb Haemost 2010; 103: 525–534

Introduction

Hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler-Weber syndrome, is an autosomal dominant vascular disease with incomplete penetrance characterised by localised angiodysplasia. This is manifested as epistaxis, mucocutaneous and gastrointestinal telangiectases, and arteriovenous malformations (AVM) in the pulmonary, cerebral or hepatic circulation (1). The prevalence is on average between 1:5,000/8,000, although it is higher in some regions, such as the Jura region in France, Funen Island in Denmark and certain Caribbean islands in the Netherland Antilles (2, 3). Its prevalence in Spain has been calculated to be around one in 8,000, according to HHT studies in progress since 2003 (4, 5). There are two main HHT types, type 1 and type 2, which are caused by mutations in *Endoglin* (*ENG*) and *ALK1* (*ACVRL1*) genes, respectively (6, 7). In around 2% of all HHT patients the origin of the disease is a mutation in the *MADH4* gene, leading to the combined syndrome of juvenile polyposis and HHT (JPHT) (8). A common property for all these genes is the peculiarity of coding for proteins involved in the transforming growth factor β (TGF- β)-signalling pathway,

critical for the proper development of the blood vessels. Recently, the third and fourth HHT loci for unknown genes have been described in chromosomes 5 (HHT3) and 7 (HHT4), respectively (9, 10). It is generally accepted that Endoglin or ALK1 haploinsufficiency is the origin for the pathogeny of the disease (11). Therefore, the identification of drugs able to increase the expression of those genes is essential to propose new therapies for HHT.

The most frequent clinical manifestation of HHT is epistaxis (nose bleeds), normally from light to moderate (12–14). However, some patients show severe epistaxis which notably interferes with their quality of life. The origin of this epistaxis is the existence of telangiectases on the nasal mucosa. As a consequence of these vascular alterations, telangiectases are very sensitive to slight traumata and even to the friction with the air when breathing, which gives rise to nose bleeds. There is no optimal treatment for the epistaxis in HHT patients. Many different therapies have been proposed but none of them with conclusive results. The use of antifibrinolytic agents, such as ϵ -aminocaproic or tranexamic acids, systemically administered using oral administration show satisfactory results with an improvement in epistaxis and the associated anaemia (15, 16).

Immunosuppressor FK506 Increases Endoglin and Activin Receptor-Like Kinase 1 Expression and Modulates Transforming Growth Factor- β 1 Signaling in Endothelial Cells

Virginia Albiñana, Francisco Sanz-Rodríguez, Lucía Recio-Poveda, Carmelo Bernabéu, and Luisa M. Botella

Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) (V.A., L.R.P., C.B., L.M.B.); and Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Madrid (F.S.R.), Madrid, Spain

Received July 12, 2010; accepted February 10, 2011

ABSTRACT

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler-Weber syndrome, is an autosomal-dominant vascular disease. The clinical manifestations are epistaxis, mucocutaneous and gastrointestinal telangiectases, and arteriovenous malformations in internal organs. Patients show severe epistaxis, and/or gastrointestinal bleeding, both of which notably interfere with their quality of life. There are two predominant types of HHT caused by mutations in *endoglin* (*ENG*) and *ACVRL1/activin receptor-like kinase 1* (*ALK1*) genes, named HHT1 and HHT2, respectively. *ENG* and *ALK1* code for proteins involved in the transforming growth factor (TGF)- β 1 signaling pathway, and it is widely accepted that HHT pathogenicity results from haploinsufficiency. No cure for HHT has been found, so identification of drugs able to increase the expression of these genes is essential when proposing new therapies. We report the efficacy

of tacrolimus (FK506) in increasing *ENG* and *ALK1* expression. The rationale comes from a case report of a patient with HHT who received a liver transplantation after hepatic failure due to a liver arteriovenous malformation. The liver was transplanted, and the immunosuppressor FK506 was used to prevent the rejection. After the first month of FK506 treatment, the internal and external telangiectases, epistaxes, and anemia disappeared. Here, we find that the immunosuppressor FK506 increases the protein and mRNA expression of *ENG* and *ALK1* in cultured endothelial cells and enhances the TGF- β 1/*ALK1* signaling pathway and endothelial cell functions like tubulogenesis and migration. These results suggest that the mechanism of action of FK506 involves a partial correction of endoglin and *ALK1* haploinsufficiency and may therefore be an interesting drug for use in patients with HHT who undergo transplantation.

Introduction

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler-Weber syndrome, is an autosomal-dominant vascular disease with incomplete penetrance characterized by localized angiodysplasia. This is manifested as epistaxis, mucocutaneous and gastrointestinal telangiectases, and arterio-

venous malformations in the pulmonary, cerebral, or hepatic circulation (Shovlin and Letarte, 1999). HHT prevalence is on average between 1:5000/8000, although it is higher in specific areas, such as the Jura region in France, Funen Island in Denmark and certain Caribbean islands in the Netherlands Antilles (Jessurun et al., 1993; Kjeldsen et al., 1999). Its prevalence in Spain has been calculated to be around one in 8000, according to HHT studies in progress since 2003 (Fernandez et al., 2006; Fontalba et al., 2008). There are two main HHT types, types 1 and 2, that are caused by mutations in *endoglin* (*ENG*) and *ACVRL1* (*ALK1*) genes, respectively (McAllister et al., 1994; Johnson et al., 1996). In approximately 2% of all patients with HHT, the origin of the disease is a mutation in the *MADH4* gene, which

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación [Grants SAF2008-01218, SAF2007-61827, and SAF2010-19222]. The therapeutic in vitro assays in HHT were supported by Fundación Ramón Areces of Spain (Rare and Emergent Diseases) and a Fundación Ramón Areces fellowship (to V.A.).

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.110.067447.

ABBREVIATIONS: HHT, hereditary hemorrhagic telangiectasia; *ENG*, endoglin; *ACVRL/ALK1*, activin receptor-like kinase 1; FKBP12, FK binding protein 12; Id1, inhibitor differentiation 1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; TGF- β 1, transforming growth factor β 1; Smad, similar mother against decapentaplegic; FK506, tacrolimus; RI, receptor I; HMEC-1, human microvascular endothelial cell; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; GST, glutathione transferase; ChIP, chromatin immunoprecipitation; SBE, similar mother against decapentaplegic-binding element; VSMC, vascular smooth muscle cell; NFAT, nuclear factor of activated T cells; BRE, bone morphogenic protein-responsive element.



Propranolol as antiangiogenic candidate for the therapy of Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia

Journal:	<i>Thrombosis and Haemostasis</i>
Manuscript ID:	TH-11-11-0809.R1
Manuscript Type:	Basic/Clinical Studies: blood coagulation, fibrinolysis and cellular haemostasis
Category:	Basic Science
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Albiñana, Virginia; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS, Cellular and Molecular medicine Recio-Poveda, Lucia; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS, Cellular and Molecular medicine Zarrabeitia, Roberto; Hospital Sierrallana, Internal Medicine Bernabeu, Carmelo; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS. CSIC, Cellular and Molecular medicine BOTELLA, LUISA; CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS. CSIC, Cellular and Molecular medicine
Keywords:	Angiogenesis and inhibitors, Apoptosis, Endothelial cells